

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A HYPOPHYSIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP) HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ IDEGRENDSZERI KÁROSODÁSOKAT MODELLEZŐ ÁLLATKÍSÉRLETEKBEN

Dr. Tamás Andrea

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet

Témavezetők: Dr. Reglődi Dóra, Dr. Lengvári István
Programvezető: Dr. Csernus Valér

Pécs, 2005.

I. BEVEZETÉS

Az idegrendszeri károsodást modellező állatkísérleteket széles körben használják az egyes klinikai kórképek etiológiájának, patomechanizmusának és terápiás lehetőségeinek vizsgálatára. Az egyes anyagokat a klinikai gyakorlatban csak akkor lehet alkalmazni, ha korábban *in vivo* állatkísérletben is bizonyítják védő hatásukat. Kutatócsoportunk célja a hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) neuroprotektív hatásának széleskörű megismerése, ezért hatását különböző állatkísérletes modellekben vizsgáljuk. Értekezésem a fokális cerebrális ischaemia, Parkinson-kór, Huntington-chorea és monosodium glutamát okozta retinális degeneráció modellekben elért eredményeket foglalja össze.

A cerebrovascularis elváltozások következményeképpen kialakuló súlyos kórképek és ezek komplikációi képezik fejlett országokban az egyik leggyakoribb halálokot a daganatos és a cardiovascularis betegségek mellett. Az ischaemiás károsodás egyik leggyakoribb oka az a. cerebri media vagy ágainak elzáródása embolisatio miatt (az összes agyi embólia 82%-a), ezért a kutatások során is az egyik gyakran alkalmazott fokális ischaemia modell, az a. cerebri media okklúzió. Vizsgálataink első részében arra kerestük a választ, hogy a PACAP csökkenti-e az infarktus nagyságát és javítja-e a neurológiai jeleket akkor, ha preventíven az okklúzió előtt adjuk. Korábbi kísérletekben már bebizonyították, hogy a PACAP védő hatást fejt ki globális és tranziens fokális ischaemiában, ezért mi permanens ischaemiában vizsgáltuk a peptid hatását.

A neurodegeneratív megbetegedésekre, mint például a Parkinson-kór és a Huntington-chorea, egy-egy sejtcsoport progresszív pusztulása jellemző. Kísérleteink során a Parkinson-kór modellben 6-hydroxidopamin (6-OHDA) segítségével a bal oldalon roncsoltuk a substantia nigra dopaminerg sejtjeit, míg a Huntington-chorea modellben a bal oldali striatumot károsítottuk lokálisan adott quinolinsav injekcióval.

A Parkinson-kór ismeretlen eredetű progresszív neurodegeneratív megbetegedés, melynek hátterében a substantia nigra pars compacta dopamin tartalmú sejtjeinek pusztulása áll. A nigrostriatalis rendszer dopamin szintjének csökkenése felelős a betegséghez kapcsolódó különböző motoros rendellenességekért. A betegség vezető klinikai tünetei a hipokinézis, a rigor és a tremor, későbbi stádiumban a tartási instabilitás. Jól ismert, hogy a betegség gyakrabban fordul elő az idősebb korosztályban, és a betegség progressziója is gyorsabb ebben az életkorban. Az is jól ismert, hogy a betegség nagyobb számban érinti a férfiakat, de a betegség progressziójának nemi különbségeiről számos ellentmondásos adat létezik. A legtöbb állatkísérletben, melyben a dopaminerg sejtpusztulás mechanizmusát és az esetleges neuroprotektív szerek hatását vizsgálják, fiatal hím állatokat használnak a betegség modellezésére, és csak kis százalékában használnak idős állatokat. Az elmúlt években néhányan már hangsúlyozták az idős állatok alkalmazásának jelentőségét a Parkinson-kór preklinikai kutatásában, mert a korosodó állatokon végzett kísérletek relevánsabban modellezik az embereknél is elsősorban idős korban jelentkező betegséget. Nagyon kevés olyan kutatási eredmény áll rendelkezésünkre, amely az öreg állatok komplex viselkedési mintázatát értékeli a dopaminerg rendszer neurotoxikus károsodását követően, és emellett a nőstény állatokra vonatkozóan is csak korlátozott számú adattal rendelkezünk. Vizsgálataink második részének célja az öreg és fiatal, hím és nőstény állatok részletes összehasonlító magatartási vizsgálata a substantia nigra 6-OHDA lézióját követően.

Korábbi kísérletekben már bebizonyították, hogy a PACAP kezelés megvédi a mesencephalicus sejt kultúrákat a 6-OHDA neurotoxikus hatásával szemben, ezért vizsgálataink harmadik szakaszában célul tűztük ki a különböző dózisu PACAP hatásának vizsgálatát 6-OHDA léziót követő neurológiai változásokra, és a substantia nigrában és a ventralis tegmentalis areában észlelt morfológiai eltérésekre.

A Huntington-chorea egy örökletes neurodegeneratív betegség, melyet a choreiform mozgások mellett pszichológiai és kognitív zavarok is jellemeznek. A striatális neuronok károsodása számos magatartásbeli eltérést okoz az állatokban. A léziót követően fokozódik az aktivitásuk, csökken a haloperidol indukálta katalepszia mértéke, ezen kívül károsodnak a kognitív funkciók is. A számos neurotoxikus anyag közül a quinolinsav lézió az, ami legjobban modellezi a betegséget. Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a PACAP védő hatást fejt ki a neurodegeneratív sejtpusztulásért felelős folyamatokkal szemben (pl.: oxidatív stressz, inflammatorikus folyamatok és különböző toxikus hatások), ezért vizsgálataink negyedik részében a PACAP kezelés hatását Huntington-chorea modellben is megvizsgáltuk.

A leggyakrabban alkalmazott excitotoxikus anyagok közé sorolhatjuk a glutamát analógokat. Már régóta ismert, hogy a szisztémás monosodium glutamát (MSG) kezelés újszülött patkányokban, és intravitrealis kezelés felnőtt patkányokban a retina belső rétegeinek súlyos degenerációjához vezet. Eddig még nagyon kevés kísérletben vizsgáltak neuroprotektív szereket retinális károsodásban, és mivel a PACAP védő hatását már több neuronális károsodást modellező állatkísérletben leírták, vizsgálataink ötödik részében a PACAP védő hatását vizsgáltuk MSG kezelés következtében kialakuló retinális károsodásban.

II. HYPOPHYSIS ADENILÁT-CIKLÁZ AKTIVÁLÓ POLIPEPTID (PACAP)

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet, vagy angol neve alapján mozaikszóval PACAP-ot, 1989-ben izolálták birka hypothalamusból a hypophysisben kifejtette adenilát-cikláz aktiváló hatása segítségével. A PACAP tagja a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinalis polipeptid (VIP) peptidcsaládnak. Szerkezete 67%-ban megegyezik VIP struktúrájával.

A szervezetben két, biológiailag aktív amidált formában fordul elő, ennek kb. 90%-át a 38 aminosavból álló PACAP-38, a kisebb részét a 27 aminosavat tartalmazó PACAP-27 teszi ki. A peptidek szekvenciája csak kis mértékben különbözik az emberben található PACAP-tól birkában, patkányban, alacsonyabb rendű gerinces és előgerinchúros állatokban. Ezen adatok azt bizonyítják, hogy a filogenetikai fejlődés során szinte változatlanul konzerválódott molekula alapvető élettani funkcióval rendelkezik.

Megjelenését és funkcióját tekintve, az ún. „brain-gut” (neurointestinalis) peptidek közé sorolható, vagyis megtalálható nemcsak a központi és perifériás idegrendszerben, hanem más szövetekben is, többek között az endokrin mirigyekben és a gastrointestinalis tractus teljes hosszában.

Mivel kísérleteink során a PACAP hatását retinális degenerációban is vizsgáltuk ezért fontos kiemelni, hogy már számos fajban vizsgálták a PACAP eloszlását a retina különböző rétegeiben. Patkány retinában immunhisztokémiai módszerrel kimutatható a PACAP az amakrin és a horizontális sejtekben, a belső rostos rétegben (IPL), a ganglion sejtek rétegében (GCL) és az optikus rostok rétegében.

A PACAP felfedezése óta széles körben vizsgálják, és számos kísérletben bebizonyították már neurotrofik és neuroprotektív hatását.

III. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során célul tűztük ki a PACAP neuroprotektív hatásának széleskörű megismerését, ezért a PACAP kezelés hatását különböző idegrendszeri károsodásokat modellező állatkísérletekben vizsgáltuk.

1., Először a preventív intracerebroventricularis PACAP kezelés hatását vizsgáltuk a cerebri media okklúziót követő fokális cerebrális ischaemiában. A vizsgálat során a léziót követően neurológiai és orientációs tesztet végeztünk a kialakuló magatartási eltérések detektálására. Az elhalt terület kimutatásához 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridot (TTC) használtunk. Ezen kívül vizsgáltuk a PACAP hatását a szisztémás vérnyomásra és a lokális agyi keringésre.

2., Ezt követő vizsgálatainkban az egyik gyakran használt Parkinson-kór modellt alkalmaztuk, ahol a substantia nigra sejtjeit lokálisan adott 6-OHDA injekcióval roncsoltuk az egyik oldalon. Mivel a legtöbb kísérletben a Parkinson-kór modellezéséhez fiatal hím állatokat alkalmaznak, ezért a PACAP-pal folytatott kísérleteink előtt a 6-OHDA lézió hatását különböző nemű és korú állatokon vizsgáltuk. A lézió után értékeltük a motoros aktivitási jeleket és a féloldali lézió következtében kialakuló aszimmetrikus tüneteket, majd tirozin-hidroxiláz immunhisztokémia segítségével jelöltük a substantia nigra és a ventralis tegmentalis area dopaminerg sejtjeit a lézió nagyságának megállapításához.

3., Ezen kísérleteket követte a lokális PACAP kezelés hatásának vizsgálata fiatal hím állatokban, ahol a korábban részletezett vizsgálatokat végeztük a 6-OHDA lézió után, de ezt apomorfín rotációs teszttel is kiegészítettük.

4., Ezután egy gyakran alkalmazott Huntington-chorea modellben, a quinolinsav indukálta egyoldali intrastrialis lézióban vizsgáltuk a lokális PACAP kezelés hatását. A léziót követően a Parkinson-kór vizsgálata során is használt magatartási teszteket katepszin A teszttel egészítettük ki, és NADPH-diaforáz festéssel jelöltük a striatalis sejteket.

5., Végül az egyoldali intravitrealis PACAP kezelés hatását vizsgáltuk szisztémás glutamát kezelés indukálta retinális degenerációban. A léziót követően Nissl festéssel festettük meg a retina sejtjeit, és a rétegek vastagságának elemzésével állapítottuk meg a lézió mértékét.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A. Állatok előkészítése

Az állatok elhelyezése, gondozása és felhasználása a Pécsi Tudományegyetem ellenőrzött protokollja (No: BA02/2000-31/2001) szerint az intézeti ajánlások figyelembevételével történt. Ezt a protokollt követtük minden állatkísérletben.

B. Állatkísérletes modellek

a. A fokális cerebrális ischaemia modell

A vizsgálatokat 200-340 gramm súlyú felnőtt hím Wistar patkányokon végeztük. A műtét során elzártuk az a. cerebri mediát Longa módszere szerint. Az altatáshoz pentobarbitált alkalmaztunk (35 mg/kg), amit intraperitonealisan adtunk be.

b. A Parkinson-kór modell

A Parkinson-kór modellezéséhez 200-300 gramm súlyú 3 hónapos hím (n=46) és nőstény (n=10) és 18-20 hónapos 350-450 gramm súlyú hím és nőstény (n=8 mindkét csoportban) Wistar patkányokat használtunk. Az állatok bal substantia nigráját 2 µl 4 µg/µl koncentrációjú 0,2% aszkorbinsavat is tartalmazó 6-OHDA-nal roncsoltuk. Az stereotaxiás műtét során az altatáshoz pentobarbitált használtunk ip (35mg/ttkg). A stereotaxiás műtét koordinátái: bregma ponttól 3 mm-re caudalisan és 2 mm-re balra, majd a kemény agyhártyától 8,5 mm-re az agyalap felé. Normál kontroll csoportként csak 2 µl fiziológiás sóoldattal kezelt állatokat használtunk.

c. Huntington-chorea modell

A Huntington-chorea modellezéséhez 200-250 gramm súlyú hím Wistar patkányokat használtunk (n=22). Az állatok bal oldali striatumát 180 nmol/ 2 µl koncentrációjú quinolinsavval roncsoltuk. A stereotaxiás műtét koordinátái: bregma ponttól 1,3 mm-re caudalisan, 3 mm-re balra és a kemény agyhártyától 5 mm-re az agyalap felé.

d. A monosodium glutamát indukálta retinális degeneráció modell

A vizsgálatsorozatot 1 napos Wistar újszülött patkányokon végeztük. Az újszülött hím és nőstény patkányokba szubkután juttattuk be a fiziológiás sóoldatban feloldott MSG-t 2 mg/testsúly dózisban 3 alkalommal a születést követő 1., 5. és 9. napon.

C. PACAP kezelés módja

a. PACAP kezelés módja fokális cerebrális ischaemia modellben

A vizsgálat során a különböző dózisú PACAP-ot stereotaxiás készülék segítségével icv adtuk be. A különböző dózisú PACAP-ot fiziológiás sóoldattal 2 µl-re hígítottuk. A vizsgálat első felében az állatokat 0,25 µg (n=8), 0,5 µg (n=10), 1 µg (n=10), 2 µg (n=9) valamint 4 µg (n=8) PACAP-pal kezeltük, és 12 órával az operáció után vizsgáltuk az infarktus nagyságát. A kontroll csoport állatai 2 µl fiziológiás sóoldatot kaptak (n=10). Mivel az alkalmazott dózisok közül csak a 2 µg PACAP bizonyult hatékonynak, ezért vizsgálatunk második felében csak ezen dózissal kezeltük az állatokat (n=12), és 24 órával az operáció után vizsgáltuk az infarktus nagyságát. A kontroll csoport 2 µl fiziológiás sóoldatot kapott (n=12). Végezetül vizsgálatunk harmadik szakaszában az állatokat 2 µg PACAP-pal (n=18) kezeltük a műtétet megelőzően 7 napig. A PACAP-ot naponta egy alkalommal megegyező időpontokban (13.00 és 15.00 óra között) adtuk be. A kontroll állatok itt is 2 µl fiziológiás sóoldatot kaptak (n=18).

b. PACAP kezelés módja Parkinson-kór modellben

A PACAP kezelés során a fiatal hím Wistar patkányokat négy csoportba osztottuk. Az egyik csoport 0,01 µg (n=8), a második 0,1 µg (n=8), a harmadik 1 µg (n=12) PACAP kezelésben részesült a 6-OHDA lézió előtt, a negyedik csoport állatai 2 µl fiziológiás sóoldatot kaptak (n=8). A PACAP-ot 2 µl fiziológiás sóoldatban oldottuk fel, és Hamilton fecskendő segítségével juttattuk be a substantia nigrába, a lézióval megegyező korábban megadott koordinátákat alkalmazva.

c. PACAP kezelés módja Huntington-chorea modellben

A PACAP kezelés során az állatokat 0,2 µg (n=7) vagy 2 µg PACAP-pal kezeltük a quinolinsav lézió előtt (n=8), a harmadik csoport állatai 2 µl fiziológiás sóoldatot kaptak (n=7). A PACAP-ot 2 µl fiziológiás sóoldatban oldottuk fel, és Hamilton fecskendő segítségével juttattuk be a striatumba, a lézióval megegyező korábban megadott koordinátákat alkalmazva.

d. PACAP kezelés módja monosodium glutamát indukálta retinális degeneráció modellben

A PACAP kezelés során az első csoport állatainak egyik oldalon intravitrealisan 1 pmol (n=8) PACAP-ot adtunk postnatális 1., 5., és 9. napon az MSG kezeléssel egyidőben, míg a másik csoport egyedei 100 pmol (n=8) PACAP kezelésben részesültek. Mindkét esetben a PACAP-ot 5 µl fiziológiás sóoldatban oldottuk fel. Vizsgálatunk során ugyanazon patkány jobb (PACAP kezelt) szeméhez bal (csak MSG kezelt) szemét kontrollként használtuk.

D. Magatartásvizsgálatok

a. Magatartásvizsgálat fokális cerebrális ischaemia modellben, orientációs teszt

Annak érdekében, hogy még pontosabban vizsgáljuk az ischaemia után kialakuló neurológiai eltéréseket és szenzomotoros változásokat, orientációs teszteket is végeztünk. A kísérlet során az első csoport 2 µl fiziológiás sóoldatban oldott 2 µg PACAP-ot (n=8), a második csoport 2 µl fiziológiás sóoldatot kapott (n=6) intracerebroventricularisan, majd elzártuk az a. cerebri media eredését. A harmadik és negyedik csoport egyedei hasonló kezelést kaptak (PACAP n=6, kontroll n=6), de itt csak áloperációt végeztünk. Az állatok különböző szenzoros stimulusokkal kiváltott orientációját két nappal az operáció után vizsgáltuk. A kísérlet során mértük az állatok reakcióidejét másodpercben.

b. Magatartásvizsgálat Parkinson-kór modellben

1. Motoros aktivitás és aszimmetrikus jelek vizsgálata

A Parkinson-kór ezen modelljében a legjellemzőbb tünetek a hipokinézia és az egyoldali roncsolás következtében kialakuló aszimmetrikus neurológiai jelek. Az aszimmetrikus jelek dominálnak a léziót követő napokban, de néhány nap múlva spontán részleges javulás észlelhető. Emiatt a magatartási vizsgálatokhoz több időpontot is választottunk. Open-field tesztet végeztünk 1 nappal a lézió előtt, 1 és 10 nappal a léziót követően.

A magatartási jeleket két fő csoportba osztottuk, vizsgáltuk a hipokinetikus jeleket valamint a féloldali lézió következményeképpen kialakuló aszimmetrikus jeleket. A motoros aktivitás értékelése során mértük a mozgással eltöltött időt és a 15 perc alatt megtett távolságot, az ágaskodások számát és a teljes nyugalmi időt. Az aszimmetrikus jelek értékelése kapcsán vizsgáltuk a spontán jobbra és balra irányuló forgásokat, az aszimmetrikus ágaskodást és thigmotaxist.

2. Apomorphin-teszt

A műtét utáni 2. héten apomorfínnal indukált forgási tesztet végeztünk. Az egyoldali roncsolás miatt oldalkülönbség alakult ki a dopamin receptor agonista apomorfínnal szembeni érzékenységre. Az állatok 0,1 mg/kg apomorfint kaptak szubkután, mely a lézióval ellentétes oldalra irányuló forgó mozgást váltott ki. Ezt a beadást követően 30 percig ellenőriztük, számoltuk a 360 fokos jobbra irányuló forgások számát. Mindezen motoros tesztekben a lézió súlyosságára, illetve a javulási tendenciára tudunk következtetni.

c. Magatartásvizsgálat Huntington-chorea modellben

1. Motoros aktivitás és aszimmetrikus jelek vizsgálata

A Huntington-chorea ezen modelljében a legjellemzőbb tünetek a hiperkinézia és az egyoldali roncsolás következtében kialakuló aszimmetrikus neurológiai jelek. A magatartási vizsgálatot a Parkinson-kór modellnél részletezett protokoll alapján végeztük, de itt 30 nappal a lézió után is megvizsgáltuk az állatokat.

Az értékelés során vizsgáltuk az állatok aktív mozgással eltöltött idejét és az összes forgások számát, melyek a hiperkinézia súlyosságát mutatják. Az aszimmetrikus jelek közül értékeltük az aszimmetrikus forgást, ágaskodó magatartást és thigmotaxist.

2. Katalepszia teszt

A műtét után 3 héttel haloperidol indukálta katalepszia tesztet végeztünk. Az állatokat 0,5 mg/kg haloperidollal kezeltük ip és két órával a beadást követően végeztük el a teszteket. A katalepszia teszt során az állatok mellső végtagjait egy 7 cm és egy 10 cm magasra helyezett rúdra, valamint egy oldalára döntött 7 cm átmérőjű befőttes üveg oldalára helyeztük, és mértük a mozdulatlansággal eltöltött időt.

E. Morfológiai vizsgálatok

a. A károsodott agyterület értékelése fokális cerebrális ischaemia modellben

A vizsgálatról függően 12, 24 órával a műtét után éter narkózisban dekapitáltuk az állatokat. Az agyból szeletelő mátrix segítségével szeletet készítettünk. Az elhalt területek és az épen maradt részek arányának pontos megállapításához 2%-os fizesológias sóoldatban oldott 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridot (TTC) használtunk. A festék a mitokondriális reduktázok kimutatására alkalmas, melyek az ép sejtekben a tetrazolium sötét egy sötétvörös vegyületté alakítják át, az elhalt terület pedig nem festődik. Az elhalt terület nagyságát az egész agyterület százalékában adtuk meg, így lehetőség nyílt az egyes infarktusok nagyságának összehasonlítására.

b. Szöveti vizsgálat Parkinson-kór modellben

A viselkedési teszteket követően az állatok agyát fixálás után eltávolítottuk, és 50 µm-es frontális metszeteket készítettünk a substantia nigra területéből. A dopaminerg neuronokat tirozin-hidroxilázal (TH), a dopamin szintézis enzimjének immunhisztokémiai kimutatásával azonosítottuk TH elleni monoklonális egér antitestet használva.

Mind az ipsilateralis oldalon a substantia nigra pars compacta területén (A9 sejtcsoport) és a ventralis tegmentalis areában (A10 sejtcsoport) megszámoltuk a TH-pozitív sejteket. A sérült oldal sejtszámát az ép oldal százalékában adtuk meg.

c. Szövetteni vizsgálat Huntington-chorea modellben

A quinolinsav intrastriatális injekciója szelektív neuronális károsodást hoz létre a striatumban. Az aktivitási tesztek befejezése után az állatokat fixáltuk, és az agy striatumot tartalmazó részéből metszeteket készítve, NADPH-diaforáz festéssel megfestettük. A korábban leírt módszer szerint mind a contralateralis, mind az ipsilateralis oldalon a striatum területén megszámoltuk a NADPH-diaforáz pozitív sejteket. Ezután a sérült oldal sejtszámát az ép oldal sejtszámának százalékában adtuk meg.

d. Szövetteni vizsgálat monosodium glutamát indukálta retinális degeneráció modellben

A patkányokat 3 hetes korukban dolgoztuk fel. Altatás után a patkányokat fixáltuk, és mindkét szemüket eltávolítottuk. A retinából készített félvékony metszeteket Nissl szerint megfestettük. A retinarétegek vastagságának értékeléséhez NIH Image 1.55 programot alkalmaztunk, ahol a különböző rétegek vastagságát azonos területről készült metszetben mértük le. Vizsgálatunk során lemértük a belső sejtes réteg (INL) és a belső rostos réteg (IPL) vastagságát, valamint a külső és a belső határhártya közti távolságot (ILM-OLM távolság), így módon kizártuk a külső fotoreceptorok nagyfokú variabilitása miatt kialakuló különbségeket.

F. A testhőmérséklet, a szisztémás vérnyomás és lokális agyi keringés vizsgálata

A műtét alatt az állatok hőmérsékletét rectalis hőmérővel ellenőriztük, ugyanis korábbi vizsgálatok során megfigyelték, hogy az infarktus következményeképpen kialakuló magas hőmérséklet befolyásolja a nekrotikus terület nagyságát.

A keringés nagymértékben befolyásolja az ischaemiás károsodás mértékét, ezért kísérleteink során regisztráltuk a patkány artériás vérnyomásának változását PACAP kezelés után aorta abdominalis kanül segítségével. Emellett az állat végtagjaira EKG-elektrodákat helyeztünk, így pulzusát is mérni tudtuk. A 2 µg PACAP-ot a mérés során intracerebroventricularisan adtuk be. A beadást követően 1, 5, 10, 15, 20, 25 perccel rögzítettük a vérnyomást.

Egy másik kísérletben (n=6) pentobarbitál anesztézia alatt a parietalis cortex keringését mértük lézer dopplerrel. A bregma mögött 1 mm-re, 5 mm-re balra 1 mm átmérőjű nyílást fúrtunk, majd a detektort az ép dura felszínére helyeztük. Fiziológias sóoldatot fecskendeztünk a detektor és a dura közé, hogy a vizsgálat során a direkt kontaktus fennmaradjon. Az állatok bal oldalkamrájába 2 µg PACAP-ot valamint fiziológias sóoldatot injektáltunk, és a lokális agyi keringés változását 1 órán keresztül mértük. Az értékeket a beavatkozás előtt mért értékek százalékában adtuk meg.

G. Statisztika

Az eredményeket átlag±SEM formában adtuk meg. A magatartásvizsgálatok parametrikus adatait ANOVA teszttel hasonlítottuk össze, melyet Neumann-Keul post-hoc analízis követett. A tesztek nonparametrikus adatait, valamint a forgások számát Dunn post-hoc analízissel értékeltük a nonparametrikus ANOVA tesztet követően. Az aszimmetria fokát egy csoporton belül Mann-Whitney teszttel vizsgáltuk. A TH-pozitív sejtek számát Dunn post-hoc analízissel hasonlítottuk össze a varianciaanalízist követően. A NADPH-diaforáz

pozitív sejtek számát a léziós és az ép oldalon Student-t teszttel hasonlítottuk össze. A különböző retinális rétegek vastagságának összehasonlításához ANOVA tesztet alkalmaztunk, majd ezután Neumann-Keul's posthoc analízis követett. A $P < 0,05$ eredmények esetén az eltérést szignifikánsnak tekintettük.

V. PREVENTÍV PACAP KEZELÉS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA FOKÁLIS CEREBRÁLIS ISCHAEMIÁBAN

A. Eredmények

a. Orientációs teszt

Az orientációs tesztben nem találtunk szignifikáns eltérést a csoportok között az operáció előtt. Az áloperált állatok értékei a műtét után sem változtak szignifikánsan. Ezzel szemben az a. cerebri media elzárása után a contralateralis oldalon mért reakcióidők szignifikánsan növekedtek mind a kontroll, mind a PACAP kezelt csoportoknál. A kontroll és a PACAP-pal kezelt léziós állatok értékei közt csak egy tesztben találtunk szignifikáns eltérést. A PACAP-pal kezelt állatok szignifikánsan rövidebb idő alatt reagáltak a hátsó testrész érintésére, mint a kontroll állatok.

b. Károsodott agyterület nagyságának értékelése

A kísérletünk első felében az állatokat 12 órával a léziót követően dolgoztuk fel. A 250 ng-os, 500 ng-os, 1 µg-os és 4 µg-os PACAP dózissal nem értünk el szignifikáns csökkenést az infarktus nagyságában. Ezzel szemben a 2 µg-os csoportban a PACAP szignifikánsan csökkentette az infarktus nagyságát, ugyanis az infarktus területe $5,85 \pm 3,2\%$ -ra csökkent, míg a kontroll csoport infarktusának nagysága $14,85 \pm 7,2\%$ volt. 24 órával a műtétet követően a 2 µg PACAP itt is hatásosnak bizonyult, ugyanis a kontroll állatokban mért $21,53 \pm 9,4\%$ -os agykárosodást $10,25 \pm 5,3\%$ -ra csökkentette.

A preventív kezelés során, amikor az állatokat 7 napon keresztül kezeltük 2 µg PACAP-pal, hasonló eredményt értünk el, mint az egyszeri dózissal, hiszen az infarktus nagysága $10,6 \pm 2,1\%$ -a volt az egész agyterületnek, ami nem különbözött szignifikánsan az egyszeri dózistól mért $10,25 \pm 5,3\%$ -os értéktől.

c. A testhőmérséklet, a szisztémás vérnyomás és a lokális agyi keringés vizsgálata

Az állatok hőmérsékletét a műtét után minden esetben ellenőriztük, és nem találtunk szignifikáns eltérést a kontroll állatokéhoz viszonyítva.

Az artériás vérnyomás vizsgálata során nem találtunk szignifikáns eltérést a 2 µg PACAP intracerebroventricularis beadása után. A corticalis agyi keringést a PACAP intracerebroventricularis beadását követően mértük, ami a PACAP beadást követően emelkedett az első 15 percben, 20 perc múlva elérte a maximális értéket, amely szignifikánsan magasabb volt a kiindulási értéknél, majd fokozatosan visszatért az eredeti szintre.

B. Az eredmények értékelése

Kísérletünkben kimutattuk, hogy a lézió előtt intracerebroventricularisan beadott 2 µg PACAP szignifikánsan csökkent a károsodott agyterület nagyságát, és nem találtunk szignifikáns különbséget az egyszeri és a preventív kezelés hatékonysága közt.

Az orientációs test vizsgálata során azt találtuk, hogy a PACAP-pal kezelt állatok gyorsabban reagáltak a hátsó testfél érintésre, mint a kontroll állatok. Az jól ismert, hogy míg az elülső testfél reprezentációja az infarktus centrumában, addig a hátsó testfél a dorsomedialis cortexben található, ami a penumbra területéhez tartozik, és a legtöbb PACAP-pal kezelt csoportban épen maradt.

A PACAP nagy mennyiségben megtalálható az agy és a pia mater artériáinak falában, és az agyi erekben vasodilatációt hoz létre. Esetünkben a corticalis keringés a PACAP beadást követően az első 20 percben szignifikánsan emelkedett, majd fokozatosan visszatért az eredeti szintre. Hasonló eredmények születtek korábbi kísérletekben is, és bár a PACAP effektív vasodilatátora az agyi ereknek, hatását csak magasabb koncentrációban képes kifejteni.

VI. 6-OHDA INDUKÁLTA EGYOLDALI SUBSTANTIA NIGRA LÉZIÓ VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ NEMŰ ÉS KORÚ PATKÁNYOKBAN

A. Eredmények

a. Magatartásvizsgálat

A motoros aktivitás vizsgálata során a fiatal hím és nőstény állatok a 6-OHDA kezelést megelőzően szignifikánsan aktívabbak voltak, mint az öreg állatok, de az azonos korú nőstények és hímek között nem volt szignifikáns különbség. 1 nappal az operáció után az aktivitás szignifikánsan lecsökkent az összes állatcsoportban. Az öreg hímek sokkal súlyosabb hipokinetikus tüneteket mutattak, mint a fiatal hímek, de nem találtunk szignifikáns eltérést a fiatal és öreg nőstények aktivitásában 1 nappal az operációt követően. Bár az aktivitáscsökkenés sokkal súlyosabb volt a fiatal nőstény állatoknál, mint a fiatal hímeknél, az aktivitás mind a fiatal, mind az öreg nőstények esetében 10 nappal az operációt követően visszatért a normál szintre, míg a hím állatok még 10 nappal később is szignifikánsan kevesebbet mozogtak a 0 napos értékekhez képest.

Az operáció előtt az állatok közel azonos számban forogtak mindkét irányban. 1 nappal a 6-OHDA léziót követően az állatok szignifikánsan többet forogtak a bal oldalra. Az aszimmetria mind a fiatal mind az idős hímeknél 10 nappal az operációt követően is fennállt, míg a nőstény állatoknál eltűnt a bal oldali túlsúly.

1 nappal az operáció után az állatok ágaskodó mozgása is aszimmetrikus volt. Az ágaskodások számát az idős hím állatoknál nem tudtuk értékelni, mert az öreg hímek nem ágaskodtak egyet sem a megfigyelés ideje alatt. A 10. nappal az ágaskodásban csökkent a bal oldali dominancia, de a javulás csak a fiatal nőstényeknél volt szignifikáns, mivel itt az aszimmetria teljesen eltűnt. Hasonló eredményeket kaptunk a thigmotaxis vizsgálata során.

b. Szöveti vizsgálat

TH-immunhisztokémia segítségével vizsgáltuk a dopaminerg sejtek számát a substantia nigra pars compactájában mind a léziós, mind az ép oldalon. A 6-OHDA léziót követően a hím állatokban szignifikánsan csökkent a substantia nigra pars compactájában található dopaminerg sejtek száma. A dopaminerg sejtek közel 94%-a pusztult el a léziós

oldalon a hím állatokban, de szignifikáns különbséget nem találtunk a fiatal és az öreg hím állatok sejtpusztulása között. Ezzel szemben a nőstény állatoknál szignifikánsan kisebb mértékű sejtpusztulást találtunk, ami megközelítőleg 60-70%-a volt az époldali sejtszámnak

B. Az eredmények értékelése

Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a 6-OHDA léziót követően a nőstény állatoknál kevesebb dopaminerg sejt pusztult el a substantia nigrában, és a lézió következtében kialakuló magatartási eltérések is jóval enyhébbek voltak, mint a hím egyedeknél. Ebből arra következtethetünk, hogy a nőstény állatok kevésbé érzékenyek a 6-OHDA károsító hatására, mint a hím állatok. Bár az idős állatok magatartásbeli eltérései sokkal súlyosabbnak bizonyultak, a szövettani vizsgálat során nem találtunk nagyobb sejtpusztulást az öreg állatoknál, mint a fiatal patkányoknál.

Jelenleg széles körben vizsgálják az öregedés hatását a dopamin rendszerre, és az általa szabályozott magatartási jelekre, de a legtöbb esetben csak hím állatokon végeznek kísérleteket. Korábban már kimutatták, hogy a motoros aktivitás nagymértékben csökken az idős állatoknál, de az irodalomban közölt adatok közt számos ellentmondás van. Az ellentmondásos adatok ellenére azt az általános következtetést, hogy az idős állatok motoros aktivitása csökken, a mi kísérletünk is megerősítette. Ezen felül azt is kimutattuk, hogy az idős nőstények és hímek motoros aktivitása egyenlő mértékben csökken.

Az állatok különböző neurotoxikus hatásokkal szembeni érzékenységet számos faktor befolyásolja, mint például genetikai faktorok, egyedi endogén variabilitás és a kor. Az már ismert tény, hogy az idős állatok sokkal érzékenyebbek a különböző neurotoxikus károsító tényezőkkel szemben, mint a fiatal állatok. különösen abban az esetben, amikor kis mennyiségű toxint adnak az állatnak. Saját kísérletünk során azt találtuk, hogy a sejtpusztulás azonos mértékű volt az öreg és a fiatal állatoknál, de a magatartási eltérések sokkal kifejezettebbek voltak az idős állatoknál. Hasonló eredményt írt le Linder munkacsoportja is. Kísérleteink során továbbá azt az érdekes eredményt kaptuk, hogy az idős és a fiatal hím állatok egyformán javultak a 10. napra, aminek az oka az lehet, hogy a substantia nigrában azonos mennyiségű sejt pusztult el.

Korábbi kísérletekben a magatartási jelek vizsgálata során számos eltérést találtak a nőstény és a hím állatok között. A nőstény állatok általában sokkal aktívabbak, még gonadectomiát követően is, ami azt igazolja, hogy a nagyobb aktivitás hátterében nem csak a gonadális hormonok állnak. Vizsgálatunk során mi nem találtunk szignifikáns különbséget a fiatal nőstény és hím állatok aktivitása közt az operáció előtt, de 10 nappal az operáció után feltűnő különbség volt a két nem között: mind a fiatal és az idős nőstények szignifikánsan aktívabbak voltak, mint a hím állatok, vagyis a nőstények hipokinetikus jelei sokkal gyorsabban javultak.

Mint azt már korábban említettük, a neurotoxikus hatásokkal szembeni érzékenységet számos faktor befolyásolja. Néhány kísérletben a nemi különbségeket is vizsgálták, de ezen eredmények száma nagyon kevés. A mi eredményeink is alátámasztották ezen korábbi megfigyeléseket, ugyanis a nőstény állatok léziós oldali substantia nigrájában szignifikánsan több TH-immunpozitív sejtet találtunk 6-OHDA léziót követően, mint a hím állatokban. Ráadásul ezen eltérést az idős nőstény és hím állatok között is ki tudtuk mutatni. A magatartási vizsgálatok azt mutatták, hogy a fiatal nőstények szignifikánsan jobban javultak az operációt követően, és az idős nőstények kezdeti hipokinetikus jelei sem voltak olyan súlyosak, mint a többi csoportban.

Korábbi irodalmi adatokból ismert, hogy az aszimmetrikus jelek a posztoperatív időszakban részleges javulást mutatnak, és a javulás dinamikáját nagymértékben befolyásolja a károsodott dopaminerg sejtek száma. Azok az állatok, amelyek dopaminerg sejtjei súlyosan

károsodtak, nem mutatnak javulást az operációt követő első héten, míg a kisebb lézióval rendelkező állatok részlegesen vagy teljesen megjavulnak. Kísérletünk során azt találtuk, hogy a hím állatoknál a dopaminerg sejtek 90%-a pusztult el a léziós oldalon, míg a nőstény állatoknál a károsodás csak 50-60%-os volt. A szövettani vizsgálattal észlelt szembetűnő különbség magyarázatot adhat arra, hogy miért javultak sokkal gyorsabban a nőstény állatok hipokinetikus és aszimmetriás jelei. Az idős nőstények aszimmetrikus jelei az aszimmetrikus forgás kivételével azonban nem tűntek el teljesen 10 nappal az operáció után, aminek hátterében a kissé súlyosabb sejtkárosodás és a kompenzatórikus mechanizmusok ineffektív működése állhat.

Jelenlegi kísérletünkkel további adatokat szolgáltatunk arra, hogy 6-OHDA indukálta substantia nigra károsodás eltérő magatartási és szövettani eltéréseket okoz különböző nemű, és korú állatoknál. Ezzel a vizsgálattal is bizonyítottuk azt, hogy az egyes betegségek preklinikai kutatásában fontos szerepet töltenek be a nemi és az életkori különbségeket vizsgáló munkák, hiszen ezek nagy segítséget nyújthatnak a betegségek hatékonyabb klinikai terápiájának kidolgozásában.

VII. PACAP KEZELÉS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PARKINSON-KÓR MODELLBEN

A. Eredmények

a. Magatartásvizsgálat

A motoros aktivitás vizsgálata során a Parkinson-kórra jellemző hipokinetikus jeleket találtunk a kontroll, csak 6-OHDA-nal kezelt állatcsoportban mindkét vizsgált időpontban. Ezzel szemben csak néhány esetben találtunk szignifikáns eltérést a PACAP-pal kezelt csoportok, és a normál illetve a fizioológias sóoldattal kezelt állatok eredményei között. Legaktívabbak a 0,1 µg PACAP-pal kezelt állatok voltak a léziós csoportok közül.

Az aszimmetrikus jelek vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a 6-OHDA lézió átesett állatok szignifikáns balra irányuló forgó mozgást végeztek 1 nappal az operáció után. A 10. napra ezen aszimmetria teljesen eltűnt a PACAP-pal kezelt csoportoknál, míg a kontroll csoport egyedei későbbi időpontban is szignifikáns bal oldali túlsúlyú aszimmetriát mutattak. Hasonló eredmények születtek az aszimmetrikus ágaskodás és thigmotaxis vizsgálata során is.

b. Apomorfín indukálta forgó mozgás vizsgálata

A fizioológias sóoldattal kezelt állatoknál apomorfínnal nem tudtunk rotációs mozgást indukálni. A 6-OHDA-nal kezelt kontroll csoportban a forgások átlag mennyisége 30 perces megfigyelés alatt $186,5 \pm 33,4$ volt. A PACAP-pal kezelt csoportok egyedei szignifikánsan kevesebbet forogtak, a forgások átlag száma $65,0 \pm 26,8$, $17,06 \pm 6,9$ és $14,5 \pm 9,5$ volt az 1, 0,1 és 0,01 µg PACAP-pal kezelt csoportokban.

c. Szövettani vizsgálat eredménye

A kontroll állatcsoportban TH-immunohisztokémia segítségével súlyos dopaminerg sejtkárosodást találtunk a substantia nigra pars compactájában. A dopaminerg sejtek megközelítőleg 90%-a pusztult el a kezelés hatására a lézió oldalán. A PACAP-pal kezelt csoportoknál szintén szignifikáns mértékű sejtkárosodást észleltünk a lézió oldalán a normál állatokhoz viszonyítva, de a sejteknek itt csak az 50%-a pusztult el a kezelés hatására.

A ventralis tegmentalis areában a sejtek kevésbé sérültek a 6-OHDA kezelés hatására, mint a substantia nigra sejtjei. A kontroll csoportban a dopaminerg sejtek 60%-a pusztult el a léziós oldalon, ami szignifikáns különbségnek bizonyult a fiziológiás sóoldattal kezelt állatok sejtpusztulásához képest. Minden PACAP kezelt csoportban a sejtpusztulás aránya csak 10% volt, ami szignifikánsan kevesebb, mint a kontroll csoport sejtpusztulásának mértéke.

B. Az eredmények értékelése

A leírt eredményeink arra engednek következtetni, hogy a PACAP képes kivédeni a 6-OHDA neurotoxikus hatása következtében kialakuló hipokinéziát és elősegíti a kialakuló tünetek mielőbbi javulását. A legjobb eredményeket a 0,1 µg PACAP-pal kezelt állatoknál találtuk. Kísérletünk során kimutattuk, hogy a PACAP kezelés mindkét vizsgált agyterületben nagy mennyiségben megvédte a dopaminerg sejteket, és a neurológiai tünetekben észlelt szignifikáns javulás e két területben észlelt védő hatás együttes következménye lehet.

Korábbi kísérletekben mások kimutatták, hogy az intracerebroventricularis PACAP kezelés képes fokozni a patkányok spontán motoros aktivitását és az ágaskodásaik számát. Ezen korábbi megfigyelések alapján feltételezhetjük, hogy a PACAP motoros aktivitásra kifejtett hatása is ellensúlyozni képes a dopaminerg károsodás következtében kialakuló magatartásbeli eltéréseket.

Eredményeink azt mutatják, hogy bár a PACAP-pal kezelt állatok is súlyos aszimmetrikus jeleket mutattak a műtét után, de ezek a jelek a 10. napra teljesen eltűntek. Ezen megfigyelések szoros összefüggésben állnak az épen maradt dopaminerg sejtek mennyiségével.

Azon megfigyeléseink, mely szerint a kisebb dózisu PACAP hatásosabbnak bizonyult, megegyeznek más kutatások eredményeivel. Számos kísérletben kimutatták a PACAP dózis függő hatását, melynek hátterében az állhat, hogy a különböző dózisu PACAP más jelátviteli utakon keresztül fejt ki hatását.

VIII. PACAP KEZELÉS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA HUNTINGTON-CHOREA MODELLBEN

A. Eredmények

a. Magatartásvizsgálat

A motoros aktivitás vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a quinolinsav léziós kontroll állatok hiperkinetikusak voltak, szignifikánsan többet mozogtak 1 nappal az operációt követően a normál állatokhoz képest, de a mozgással töltött idő a 10. napra a normál szintre csökken. A 2 µg PACAP-pal kezelt állatok szintén szignifikánsan többet mozogtak, mint a normál állatok 1 és 10 nappal az operáció után. Ezzel szemben a 0,2 µg PACAP kezelésben részesült állatok egyik vizsgált időpontban sem mozogtak szignifikánsan többet, mint a normál állatok.

Az aszimmetrikus jelke rendkívül szembetűnőek volt a quinolinsavval kezelt kontroll állatoknál és a 2 µg PACAP-pal kezelt állatoknál 1 nappal az operációt követően, ami részlegesen javult a 10. napra, de további javulást nem mutatott. Ezzel szemben a 0,2 µg PACAP-pal kezelt állatok bár szignifikáns aszimmetriát mutattak 1 nappal a kezelés után, ez az aszimmetria teljesen eltűnt a 10. napra.

b. Katalepszia teszt

A rigiditási jelek vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a kontroll léziós állatok és a 2 μg PACAP-pal kezelt állatok szignifikánsan kevesebb időt töltöttek mozdulatlanul mindhárom tesztnél, mint a normál állatok. A 0,2 μg PACAP-pal kezelt állatok a normál állatokhoz hasonlóan teljesítettek a magasabb rúdon és az üveg tesztben, hiszen mindkét csoport egyedei hosszú ideig képesek voltak megtartani abnormális helyzetüket.

c. Szövetteni vizsgálat

A szövetteni vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a léziós oldalon a kontroll állatoknál a NADPH-diaforáz pozitív neuronok száma kb. 20%-al kevesebb volt, mint az ép oldalon, míg a PACAP-pal kezelt állatoknál a sejtelhalás csak 10%-a volt az ép oldalnak.

B. Az eredmények értékelése

Kísérletünkben bebizonyítottuk, hogy a quinolinsav léziót megelőző PACAP kezelés felére csökkentette a károsodott sejtek számát a striatumban, megakadályozta a hiperaktivitás kialakulását, és elősegítette a féloldali lézió következtében kialakuló aszimmetrikus jelek gyors javulását.

A kísérlet során észlelt sejtkárosodás mértéke nagymértékben eltért korábban a Parkinson-kór modellben a substantia nigra területén észlelt közel 80%-os sejtpusztulástól. Ez azzal magyarázható, hogy kísérletünk során a NADPH-diaforáz festést alkalmaztuk, amely a közepes méretű tüske nélküli neuronokat festi, amelyek relatíve megkíméltebbek a quinolinsav lézió során. Azért választottuk mégis ezt a léziót, mert az így létrejött striatalis károsodás modellezi legjobban az emberi Huntington-chorea pathomorfológiai sajátosságait. PACAP kezelés hatására megközelítőleg fele annyi sejt pusztult el a lézió után, mint a kontroll állatokban, ezzel magyarázhatóak a PACAP-pal kezelt állatok szignifikánsan jobb neurológiai tünetei.

A Parkinson-kór modellben elért eredményekhez hasonlóan itt is az alacsonyabb dózis volt a hatékonyabb, míg a nagyobb dózis esetében a kontroll állatokhoz hasonló hiperaktivitást találtunk a motoros aktivitás vizsgálata során. Mint ahogy azt már a korábbi fejezetekben részletesen leírtuk ezen eredmények hátterében a PACAP dózisfüggő hatása, valamint a magasabb koncentrációjú PACAP aktivitást fokozó hatása állhat.

A PACAP védő hatásának pontos mechanizmusa a Parkinson-kórhoz hasonlóan a Huntington-chorea modellben sem ismert. Mégis ismerve a betegségek pathomechanizmusát, és a PACAP korábban *in vitro* kísérletekben kimutatott védő hatásait számos lehetséges mechanizmus számításba jöhet. Ezeket az utolsó fejezetben tárgyaljuk.

IX. PACAP KEZELÉS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA MONOSODIUM GLUTAMÁT KEZELÉS KÖVETKEZTÉBEN KIALAKULÓ RETINÁLIS DEGENERÁCIÓBAN

A. Eredményeink

Az újszülött patkányokban MSG kezelést követően súlyos retinadegeneráció alakult ki. A kezelt állatok retinájának ILM-OLM távolsága megközelítőleg fele akkora volt ($79.7 \pm 4.5 \mu\text{m}$), mint a kezeletlen állatokban mért távolság ($163.7 \pm 5.4 \mu\text{m}$). A károsító hatások leginkább a belső retinális rétegeket érintették. A MSG kezelt állatoknál a fotoreceptor rétegben, a külső sejtes és rostos rétegben szignifikáns elváltozást nem találtunk, de a belső sejtes réteg és a ganglion sejtek rétege a háromszori MSG kezelést követően teljesen összeolvadt. Ezen rétegek vastagsága több mint felére csökkent, a köztük elhelyezkedő belső rostos réteg eltűnt. Az MSG kezelés mellett 1 pmol PACAP-pal is kezelt állatok retinája

($91,5 \pm 5,38 \mu\text{m}$) nem különbözött szignifikánsan a kontroll, a csak MSG-vel kezelt állatok retinájának szerkezetétől. Ezzel szemben a 100 pmol intravitreális PACAP kezelés szignifikánsan csökkentette az MSG kezelés indukálta retinális károsodást ($116,1 \pm 5,14 \mu\text{m}$). Bár ezen csoport állatainak retinái szignifikánsan vékonyabbak voltak, mint a normális retina vastagsága, a belső rétegek nem szenvedtek olyan súlyos károsodást, mivel mindhárom belső réteg (INL, IPL és GCL) jól láthatóan elkülönült egymástól. A belső rétegek szignifikánsan szélesebbek voltak, mint az MSG kezelt kontroll állatok belső retinális rétegei, és a retina szerkezete a normális retina struktúráját mutatta.

B. Az eredmények értékelése

Az előzőekben leírt kísérletünkben kimutattuk, hogy az intravitreális PACAP kezelés szignifikánsan csökkenti az MSG kezelés következtében kialakuló retinális károsodás mértékét. Az ismételt magas dózisú MSG kezelés rendkívül súlyos retinális degenerációt okozott legfőképpen a retina belső rétegeiben. Az még pontosan nem ismert, hogy milyen sejtek élnek túl az MSG kezelést. A belső rétegek sejtjei az ON bipoláris sejtek kivételével egyaránt rendelkeznek ionotrop glutamát receptorokkal, emiatt ezek a sejtek egyaránt lehetnek az MSG toxicitás célpontjai. Azonban a sejtek hasonló eloszlásban rendelkeznek PACAP receptorokkal is, ami magyarázhatja ezen sejtek ellenállását az exitotoxikus károsodással szemben. A belső rostos réteg nagymértékben degenerálódott MSG hatására, de a PACAP kezelt állatoknál a károsodás jóval kisebb volt. Ezen eredmény hátterében az feltételezhető, hogy az OFF bipolar sejtek rendelkeznek non-NMDA ionotrop glutamát receptorokkal, de PACAP receptor nincs a felszínükön, és emiatt lehetnek érzékenyebbek a károsító hatásokkal szemben.

X. MEGBESZÉLÉS

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a PACAP neuroprotektív hatású fokális cerebrális ischaemiában, Parkinson-kór modellben, Huntington-chorea modellben és glutamát okozta retinális károsodásban. Ezen idegrendszeri elváltozások pathomechanizmusában más-más folyamatok vesznek részt, de végül minden körképben a neuronpusztulás fő oka az oxidatív stressz és a glutamát indukálta apoptotikus sejthalál. Ezen léziókon kívül a fokális cerebrális ischaemiában és a neurodegeneratív megbetegedésekben mind állatkísérletes modellben, mind emberben az inflammatorikus hatások is fontos szerepet töltenek be. A PACAP felfedezése óta számos *in vitro* és *in vivo* kísérletben bebizonyították már neuroprotektív hatását. *In vitro*, a PACAP stimulálja a neuronok növekedését, elősegíti túlélésüket, antiapoptotikus hatással rendelkezik, és védi a neuronokat a különböző neurotoxikus hatásokkal szemben, ezenkívül segíti a neuronok differenciálódását és proliferációját a fejlődés közben, és segíti más trofikus faktorok expresszióját és hatását. A PACAP antiinflammatorikus hatását is bebizonyították már mind *in vivo*, mind *in vitro* kísérletekben. *In vivo*, a PACAP védi a hippocampus CA1 sejtjeit globális ischaemiában és a cholierg neuronokat a fornix átmetszése után. A PACAP patkányban csökkenti a károsodott agyterület nagyságát, és javítja a neurológiai jeleket fokális cerebrális ischaemiát követően. Nemrégiben bebizonyították, hogy a PACAP neuroprotektív tranziens fokális ischaemiában, és más neuronális károsodások esetén, mint például a gerincvelő, a nervus facialis sérülése esetén és a nervus opticus átmetszése után patkányban. A különböző neuropatológiás elváltozásokat követő PACAP upregulációból is arra következtethetünk, hogy fontos szerepe lehet a posttraumás regenerációs folyamatokban.

Az ischaemiás és a neurodegeneratív elváltozások mellett a retina patológiás elváltozásainak hátterében is számos esetben a glutamát indukálta idegkárosító folyamatok állnak. Mivel több kísérletben bebizonyították már a PACAP védő hatását a glutamát

indukálta neuropatológiás folyamatokban, ezért ez magyarázatul szolgálhat arra, hogy kísérleteinkben az ischaemiás és a neurodegeneratív modelleken kívül, a glutamát indukálta retinális degenerációban is csökkenteni tudtuk a lézió nagyságát.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a PACAP hatásosnak bizonyult az általunk vizsgált idegrendszeri károsodást modellező állatkísérletben, így tovább gyarapítottuk azon kísérleti eredményeket, amely a PACAP jövőbeli klinikai alkalmazásának alapjai lehetnek.

A PACAP azonban csak egyike azon számos neuroprotektív hatású anyagoknak, melyek *in vivo* kísérletekben csökkentik a károsodás mértékét különböző idegrendszeri sérülésekben. Bizonyították már többek között az ösztrogén és a hypothermia neuroprotektív hatását cerebrális ischaemiában, de a glutamát antagonisták, Ca^{2+} -csatorna blokkolók, antioxidánsok, antiinflammatorikus készítmények az ischaemián kívül a különböző neurodegeneratív és egyéb toxikus károsodások terápiájában is fontos szerepet töltenek be. A gyógyszerkísérletek középpontjában álló szerek többsége a klinikai kipróbálásban egyelőre nem bizonyult hatékonynak részben a mellékhatások, részben a nagyon szűk terápiás ablak miatt. Ezenkívül egyes szerek toxikus mellékhatásokkal rendelkeznek, és nem képesek átmenni a vér-agy gáton, ami szintén nagy problémát jelent ezen anyagok szisztémás alkalmazásában.

A PACAP klinikai alkalmazását elősegíti az, hogy endogén peptidként az emberi szervezetben számos helyen megtalálható, így a fiziológiás koncentráció exogén alkalmazása során toxikus hatásokat nem fejt ki. Ezenkívül nemcsak lokális kezelésre nyújt lehetőséget, hanem szisztémásan is alkalmazható, mivel intravénás beadását követően képes átmenni a vér-agy gáton, azonban a PACAP koncentrációja a vérben hamar csökken, ezért a folyamatos infúziós kezelés hatásosabbnak bizonyult egyes kísérletekben, mint az egyszeri dózis. Kísérleteink további célja a PACAP hatásmechanizmusának még részletesebb vizsgálata, és olyan biológiaiilag aktív fragmentumok előállítás, ami könnyebbé tenné a klinikai alkalmazást, hogy a PACAP egy ígéretes terápiás lehetőség legyen az idegrendszeri sérülések klinikai ellátásában.

XI. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1., Kimutattuk, hogy az a. cerebri media elzárása előtt intracerebroventricularisan beadott PACAP szignifikánsan csökkenti a károsodott agyterület nagyságát, és nem találtunk szignifikáns különbséget az egyszeri és a 7 napig tartó kezelés hatékonysága közt. A neurológiai vizsgálat során nem volt szignifikáns eltérést a PACAP-pal kezelt és a kontroll állatok között, ezzel ellentétben az orientációs tesztben a hátsó testfél érintését követő reakcióidő szignifikánsan csökkent a PACAP-pal kezelt állatokban a kontroll csoporthoz képest. A PACAP intracerebroventricularis beadása után a szisztémás vérnyomásban nem észleltünk változást, míg a corticalis agyi keringés a PACAP beadást követően az első 20 percben szignifikánsan emelkedett, majd fokozatosan visszatért az eredeti szintre.

2., Adatokat szolgáltatunk arra, hogy 6-OHDA indukálta substantia nigra károsodás eltérő magatartási és szövettani eltéréseket okoz különböző nemű, és korú állatoknál. Azt találtuk, hogy mind a fiatal, mind az idős hím állatok sokkal érzékenyebbek a 6-OHDA lézióra, mint a nőstény állatok, mivel a nőstényeknek szignifikánsan kevesebb dopaminerg sejtje károsodott, és emiatt szignifikánsan jobban javultak magatartási tüneteik is az operációt követően. A szövettani vizsgálat során nem találtunk nagyobb sejtpusztulást az öreg állatoknál, mint a fiatal patkányoknál, pedig az idős állatok magatartásbeli eltérései sokkal súlyosabbnak bizonyultak.

3., Bizonyítottuk a PACAP neuroprotektív hatását 6-OHDA indukálta substantia nigra lézióban. Kimutattuk, hogy a neurotoxikus lézió előtt lokálisan beadott 0,01-1 μg dózisú PACAP megvédi a dopaminerg sejtek nagy részét a substantia nigrában, és majdnem a sejtek 100%-át a ventralis tegmentalis areában. A PACAP kezelt állatok szignifikánsan jobban

teljesítettek a magatartási tesztekben, nem mutattak súlyos hipoaktivitási jeleket, és az aszimmetrikus jelek is szignifikánsan gyorsabban javultak, mint a kontroll csoport tünetei.

4., Bebizonyítottuk, hogy a quinolinsav léziót megelőző PACAP kezelés felére csökkentette a károsodott sejtek számát a striatumban, megakadályozta a hiperaktivitás kialakulását, és elősegítette a féloldali lézió következtében kialakuló aszimmetrikus jelek gyors javulását, ezen kívül a PACAP-pal kezelt állatok a normál állatokhoz hasonlóan teljesítettek a katelepszia tesztben is.

5., Elsőként mutattuk ki a PACAP glutamát indukálta neurotoxikus károsodással szembeni védő hatását patkány retinában *in vivo* körülmények között.

XIV. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Reglődi Dórának és Dr. Lengvári Istvánnak, valamint programvezetőmnek Dr. Csernus Valér professzornak, valamint Dr. Lázár Gyula professzornak, akik diákkörös korom óta támogatják tudományos tevékenységemet.

Ezúton szeretném megköszönni munkacsoportunk tagjainak Dr. Lubics Andreának és Szelier Mártának a szövettani munkában nyújtott segítséget.

Továbbá köszönetet mondok az Élettani Intézetből Dr. Lénárd László professzornak és munkacsoportjának a magatartásvizsgálatokban nyújtott segítségért, az Általános Állattani és Neurobiológiai Tanszékről Dr. Gábiel Róbert professzornak és munkacsoportjának a retinális degeneráció vizsgálatában nyújtott segítségért, valamint a Sebészeti Klinikáról Dr. Szántó Zalának a lézer doppleres vizsgálatban és a grafikus ábrák elkészítésében nyújtott segítségért. Köszönöm az Anatómiai Intézet valamennyi dolgozójának kedvességét, segítőkészségét és támogatását.

Végül de nem utolsósorban ezúton mondok köszönetet családom tagjainak, akik segítése, támogatása és megértése nélkül ez a munka nem születhetett volna meg.

XV. A DOLGOZATBAN FELHASZNÁLT PUBLIKÁCIÓK

1. **Tamás A**, Reglődi D, Szántó Z, Borsiczky B, Németh J, Lengvári I. Comparative neuroprotective effects of preischemic PACAP and VIP administration in permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neuroendocrinol Lett* 2002; 23: 249-254. IF.: 1,278.
2. **Tamás A**, Gábiel R, Rácz B, Dénes V, Kiss P, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate. *Neurosci Lett* 2004; 372: 110-113. IF.: 2,019.
3. **Tamás A**, Lubics A, Szalontay L, Lengvári I, Reglődi D. Age- and gender differences in behavioral and morphological outcome after 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Behav Brain Res* 2005; 158: 221-229. IF.: 2,992.
4. **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Protective effects of PACAP in excitotoxic striatal lesion. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
5. **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of age, gender, and gonadectomy on neurochemistry and behavior in animal models of Parkinson's disease. *Endocrine* (közlésre elfogadva) IF.: 1,515.
6. Reglődi D, **Tamás A**, Somogyvári-Vígh A, Szántó Z, Kertes E, Lénárd L, Arimura A, Lengvári I. Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides* 2002; 23: 2227-2234. IF.: 2,635.

7. Reglődi D, **Tamás A**, Lengvári I. Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Bull* 2003; 59: 459-466. IF.: 2,609.
8. Reglődi D, Lubics A, **Tamás A**, Szalontay L, Lengvari I: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson`s disease. *Behav Brain Res* 2004;151: 303-312. IF.: 2,992.
9. Reglődi D, **Tamás A**, Lubics A, Szalontay L, Lengvári I. Morphological and functional effects of PACAP in a 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regul Pept* 2004; 123: 85-95. IF.: 2,531.
10. Reglődi D, **Tamás A**, Somogyvári-Vigh A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in animal models of neurodegenerative disorders - implications for Huntington and Parkinson`s diseases. *Lett Drug Des Disc* 2005; 2: 311-315.
11. Reglődi D, **Tamás A**, Lengvári I, Tóth G, Szalontay L, Lubics A. Comparative study on the effects of PACAP in young, aging, and castrated males in a rat model of Parkinson`s disease. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.

Tézishez kapcsolódó idézhető absztraktok száma: 13; ezek impakt faktora:12,063

Tézishez kapcsolódó előadások száma: 15

Tézishez kapcsolódó posztterek száma: 25

XV. EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

1. Németh J, Jakab B, Reglődi D, Lubics A, Józsa R, Hollósy T, **Tamás A**, Lengvári I, Görcs T, Szolcsányi J. Comparative distribution of VIP in the central nervous system of various species measured by a new radioimmunoassay. *Regul Pept* 2002; 109: 3-7. IF.: 3,205.
2. Reglődi D, Kiss P, **Tamás A**, Lengvári I. The effects of PACAP and PACAP antagonist on the neurobehavioral development of newborn rats. *Behav Brain Res* 2003; 140: 131-139. IF.: 2,817.
3. Jakab B, Reglődi D, Józsa R, Hollósy T, **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Oroszi G, Szilvássy Z, Szolcsányi J, Németh J. Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J Biochem Biophys Meth* 2004; 61: 189-198. IF.: 1,302.
4. Reglődi D, Fábíán Zs, **Tamás A**, Lubics A, Szeberényi J, Alexy T, Tóth K, Márton Zs, Borsiczky B, Róth E, Szalontay L, Lengvári I. Effects of PACAP on *in vitro* and *in vivo* neuronal cell death, platelet aggregation, and production of reactive oxygen radicals. *Regul Pept* 2004; 123: 51-59. IF.: 2,531.
5. Farkas O, **Tamás A**, Zsombok A, Reglődi D, Pál J, Büki A, Lengvári I, Povlishok JT, Dóczi T. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in a rat model of traumatic brain injury. *Regul Pept* 2004; 123: 69-75. IF.: 2,531.
6. Lubics A, Reglődi D, **Tamás A**, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic/ischemic injury. *Behav Brain Res* 2005; 157: 157-165. IF.: 2,992.
7. Józsa R, Hollósy T, **Tamás A**, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide plays a role in olfactory memory formation in chicken. *Peptides* 2005; 26: 2344-2350. IF.: 2,511.
8. Kiss P, **Tamás A**, Lubics A, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I, Reglődi D. Development of neurological reflexes and motor coordination in rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotox Res* 2005 (közlésre elfogadva)
9. Gasz B, Rác B, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, **Tamás A**, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F Jr, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating

- polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides* 2005 (közlésre elfogadva) IF.: 2,511.
10. **Tamás A**, Zsombok A, Farkas O, Reglődi D, Pál J, Büki A, Lengvári I, Povlishock JT, Dóczi T. Postinjury administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) attenuates traumatically induced axonal injury in rats. *J Neurotrauma* (közlésre elfogadva) IF.: 2,866.
 11. Rácz B, **Tamás A**, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Gallyas F Jr, Róth E, Reglődi D. Involvement of ERK and CREB signalling pathways in the protective effect of PACAP on monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
 12. Kiss P, **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Szalai M, Hauser D, Horváth Zs, Rácz B, Gábel R, Babai N, Tóth G, Reglődi D. Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes and retinal degeneration. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
 13. Babai N, Atlasz T, **Tamás A**, Reglődi D, Kiss P, Gábel R. Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retina degeneration. *Neurotox Res* 2005 (közlésre elfogadva)
 14. Babai N, Atlasz T, **Tamás A**, Reglődi D, Tóth G, Kiss P, Gábel R. Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
 15. Molnár L, Pollák E, Boros Á, Reglődi D, **Tamás A**, Lengvári I, Arimura A, Lubics A. Comparative anatomy of PACAP-immunoreactive structures in the ventral nerve cord ganglia of lumbricid *Oligochaetes*. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
 16. Németh J, **Tamás A**, Józsa R, Horváth JE, Jakab B, Lengvári I, Arimura A, Lubics A, Reglődi D. Changes in PACAP levels in the central nervous system after ovariectomy and castration. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
 17. Atlasz T, Kőszegi Zs, Babai N, **Tamás A**, Reglődi D, Kovács P, Hernádi I, Gábel R. Microiontophoretically applied PACAP blocks excitatory effects of kainic acid in vivo. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
 18. Józsa R, Németh J, **Tamás A**, Hollósy T, Lubics A, Jakab B, Oláh A, Lengvári I, Arimura A, Reglődi D. Short-term fasting differentially alters PACAP and VIP levels in the brains of rats and chickens. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.
 19. Gasz B, Rácz B, Róth E, Borsiczky B, **Tamás A**, Boronkai Á, Tóth G, Reglődi D. PACAP inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. *Ann NY Acad Sci* (közlésre elfogadva) IF.: 1,789.

Tézishez nem kapcsolódó idézhető absztraktok száma: 22; ezek impakt faktora: 33,199

Tézishez nem kapcsolódó előadások száma: 3

Tézishez nem kapcsolódó posztterek száma: 37

Témához kapcsolódó publikációk impakt faktora: 22,149

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 59,326

Összes idegen idézettség: 33

Összes idézettség: 56

PH.D. THESIS

**NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF PITUITARY ADENYLATE-CYCLASE
ACTIVATING POLYPEPTIDE (PACAP) IN RAT MODELS OF
DIFFERENT TYPES OF NEURONAL INJURIES**

Andrea Tamás M.D.

University of Pécs
Medical School
Department of Anatomy

Tutors: Dóra Reglődi M.D., Ph.D, István Lengvári M.D., Ph.D.
Valér Csernus M.D., Ph.D., D. Sc.

Pécs, 2005.

I. INTRODUCTION

Animal models of different neuronal injuries are frequently used to examine the etiology, pathomechanism and the possible therapy of clinical diseases. In the clinical practice only those materials can be used which are effective in animal models. The aim of the present study was to investigate the effect of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) in focal cerebral ischemia, in a rat model of Parkinson's and Huntington disease and in monosodium glutamate-induced retinal degeneration.

Cerebrovascular disease is the third most common cause of death and a leading cause of chronic disability in western countries. One of the main cause of stroke is the occlusion of the middle cerebral artery or its branches (82 % of all occlusion). Almost all animal models of focal ischemia primarily involve unilateral occlusion of the middle cerebral artery. Recently, it has shown that PACAP reduces brain damage after global and transient focal ischemia. The first part of the present study investigated whether PACAP has neuroprotective effects when applied before the onset of permanent ischemia.

Neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease and Huntington chorea are characterized by a progressive cell loss in particular neuronal populations. The present study summarizes the results obtained in a 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced lesion of the substantia nigra, a rat model of Parkinson's disease and in a quinolinic acid (QA)-induced lesion of the striatum, a model of Huntington disease.

Parkinson's disease is a chronic neurodegenerative disorder principally caused by the progressive loss of the dopaminergic cells in the substantia nigra pars compacta. The loss of dopamine in the nigrostriatal system leads to most of the motor disturbances associated with the disease. The main clinical symptoms of the disease are hypokinesia, rigor and tremor. It is well known that the onset of the disease is more common among the elderly, and the older the patient the more rapid is the progression of the disability. It is also well established that the occurrence of Parkinson's disease is more common in men than in women, but contradictory data exist on the sex differences in the progression of the disease. Animal models are frequently used to investigate the mechanism of dopaminergic cell death and the effects of putative neuroprotective agents. Most of these studies use young adult male rats as models. A few studies point out the necessity of using aging animals in pre-clinical rodent models of Parkinson's disease in order to increase the predictive validity of the model. However, relatively few studies are available that evaluate complex behavioral patterns of aging animals following neurotoxic insults of the dopaminergic system. Data on female animals are even more limited. Therefore, the aim of the second part of present study was to give a detailed comparative behavioral and morphological analysis of young and aging male and female rats following 6-OHDA lesion of the substantia nigra.

It has been shown that pretreatment of the mesencephalic cultures with PACAP protects dopaminergic neurons against 6-OHDA-induced neurotoxicity. Therefore, the aim of the third part of present study was to compare the effects of different concentrations of PACAP on behavioral deficits and on the number of dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area in 6-OHDA-lesioned hemiparkinsonian rats.

Huntington's disease (HD) is a progressive neurodegenerative disorder, characterized by severe degeneration of basal ganglia neurons, abnormal, uncontrolled and constant choreiform movements, impaired cognitive function and emotional disturbance. Lesioning of the striatum in rodents using excitatory amino acid agonist, QA, effectively mimics the human neuropathology seen in HD. Oxidative stress, inflammation and toxic agents are involved in the pathways leading to mainly apoptotic neuronal cell death. Numerous studies show that PACAP has protective effects against all these factors both *in vitro* and *in vivo* experimental conditions. These results imply the possibility of PACAP being protective in

other neurodegenerative diseases. Therefore, the aim of the fourth part of present study was to investigate the effects of PACAP in a QA-induced lesion of the striatum, a model of Huntington disease.

The damaging effects of monosodium glutamate (MSG) treatment on the retina have long been known. Systemic treatment of neonatal rats with MSG or intravitreal injection of MSG in adult rats lead to massive degeneration of mainly the inner retinal layers. Based on the protective effects of PACAP in different models of neuronal pathologies, the aim of the fifth part of present study was to investigate the effects of PACAP in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate (MSG).

II. PITUITARY ADENYLATE-CYCLASE ACTIVATING POLYPEPTIDE (PACAP)

PACAP was first isolated from ovine hypothalami in 1989 based on its potential to increase adenylyl cyclase activity in the pituitary gland. PACAP is a member of the secretin/glucagon/VIP family, and has 67% sequence similarity with VIP.

It occurs in two amidated forms, with 38 and 27 amino acid residues. The primary structure of PACAP-38 is identical among all mammalian species examined, and it also shows marked similarity with lower vertebrates and nonvertebrates, with differences in only 1-4 amino acids. This suggests that the structure of PACAP has remained very conserved throughout phylogenesis and it may reflect its importance in fundamental functions in the nervous system.

Similar to other "brain-gut peptides" PACAP is localized not only in the central but in the peripheral nervous system and in non-neural tissues as well, such as in the endocrine glands and the gastrointestinal tract.

The distribution of PACAP has been described in the eyes of various species. In the rat retina, PACAP immunoreactivity is present in the amacrine and horizontal cells, in the inner plexiform layer (IPL), in the ganglionic cell layer (GCL) and in the nerve fiber layer.

Numerous studies show that PACAP is a neuroprotective peptide both *in vitro* and *in vivo* experimental conditions.

III. AIMS OF THE THESIS

The aim of the present study was to investigate the effect of PACAP in rat models of different types of neuronal injuries.

1., We investigated the morphological and functional effects of preischemic icv administration of PACAP as given in the form of one preischemic bolus injection or as a preventive treatment for 7 consecutive days preceding focal ischemia. The effects of icv PACAP administration on systemic blood pressure and regional cerebral blood flow are also studied.

2., Relatively few studies are available that evaluate complex behavioral patterns of aging animals following neurotoxic insults to the dopaminergic system. Data on female animals are even more limited. Therefore, the aim of the second part of present study was to give a detailed comparative behavioral and morphological analysis of young and aging male and female rats following 6-OHDA lesion of the substantia nigra.

3., Thereafter, we compared the effects of different concentrations of PACAP on behavioral deficits and on the number of dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area in 6-OHDA-lesioned hemiparkinsonian rats, we completed our behavioral tests with apomorphin-test.

4., The effects of PACAP treatment were investigated in a QA-induced unilateral lesion of the striatum, a model of Huntington's disease. Behavioral analysis was performed similarly to the rat model of Parkinson's disease and catalepsy test was also performed by haloperidol administration. Finally histological assessment of the striatum was done with NADPH-diaphorase staining.

5., Finally, we examined the possible neuroprotective effect of unilateral intravitreal PACAP treatment in retinal degeneration induced by MSG in neonatal rats. Retinas were stained with toluidin blue and the thickness of the retinal layers were measured.

IV. MATERIALS AND METHODS

A. Animals

All procedures were performed in accordance with the ethical guidelines approved by the University of Pécs (No: BA02/2000-31/2001).

B. Animal models

a. Focal cerebral ischemia model

Male Wistar rats weighing 200-340 g underwent permanent middle cerebral artery occlusion, using the intraluminal suture technique described by Longa et al. Rats were anesthetized with intraperitoneal injection of 35 mg/kg pentobarbital.

b. Model of Parkinson's disease

The following Wistar rats were used: young adult males (n=46) and females of 3 months of age weighing 200-300 g (n=10) and aging males and females of 18-20 months of age weighing 350-450 g (n=8 in both groups). Rats were anesthetized with 35 mg/kg pentobarbital. All animals were given 2 μ l of 6-OHDA solution (dissolved in physiological saline) of 4 μ g/ μ l concentration containing 0,2% ascorbic acid into the left substantia nigra (3 mm posterior, 2 mm left and 8,5 mm ventral from bregma point). Normal control animals received 2 μ l physiological saline.

c. Model of Huntington disease

Male Wistar rats weighing 200-250 g rats (n=22) were treated with 30 μ g QA/2 μ l saline injected into the left striatum (1,3 mm posterior, 3 mm left and 5 mm ventral from bregma point). Rats received 0,2 μ g (n=7), or 2 μ g PACAP (n=8) in 2 μ l saline *in loco*, preceding the QA treatment, while control animals received the same volume of saline (n=7).

d. Monosodium glutamate-induced retinal degeneration model

Litters of Wistar rat pups were used from the first postnatal day. Rat pups of both sexes were injected subcutaneously with MSG (2mg/g body weight) on days 1, 5 and 9.

C. PACAP treatments

a. PACAP treatment in focal cerebral ischemia model

During the experiment different concentrations of PACAP were administered using a stereotactic instrument. PACAP dissolved in 2 μ l physiological saline was slowly injected into the lateral ventricle. The first group of animals was treated with 0,25 μ g (n=8), 0,5 μ g (n=10), 1 μ g (n=10), 2 μ g (n=9) or 4 μ g (n=8) PACAP or vehicle (n=10) and sacrificed 12 hours after the onset of ischemia. In this experimental group, only 2 μ g PACAP proved to be effective, therefore, in the second group, animals were treated only with 2 μ g PACAP. These rats (n=12) also received a single bolus of PACAP or vehicle (n=12), and were sacrificed 24 hours after MCAO. The third group of animals was treated with 2 μ g PACAP for 7 consecutive days between 3 and 5 PM with either PACAP (n=18) or vehicle (n=18).

b. PACAP treatment in a model of Parkinson's disease

Young male animals received either 1 μ g (n=12), 0,1 μ g (n=8) or 0,01 μ g (n=8) PACAP dissolved in 2 μ l saline as pretreatment, followed by 6-OHDA lesion of the substantia nigra. Control animals received the same amount of saline (n=8).

c. PACAP treatment in a model of Huntington disease

Rats received 0,2 µg (n=7), or 2 µg PACAP (n=8) in 2 µl saline *in loco*, preceding the QA treatment, while control animals received the same volume of saline (n=7).

d. PACAP treatment in monosodium glutamate-induced retinal degeneration model

Rats were treated with unilateral (right) intravitreal injection of 1 pmol (n=8) or 100 pmol PACAP (n=8) dissolved in 5 µl physiological saline on postnatal days 1, 5, and 9. The left, untreated eyes served as control MSG-treated eyes.

D. Behavioral testing

a. Behavioral testing in focal cerebral ischemia model, orientation test

In order to obtain more detailed insight into the sensorimotor performance of ischemic rats, orientations tests were performed on a separate group of rats. Animals received preischemic 2 µg PACAP (n=8) or vehicle (n=6) treatment icv, and then underwent occlusion of the middle cerebral artery. Another group of animals received the same treatments (PACAP n=6, vehicle n=6) and then underwent only sham operation. Two days after operation, rats were tested for orientation to different sensory stimuli, and reaction times measured in milliseconds.

b. Behavioral testing in a model of Parkinson's disease

1. Motor activity and asymmetrical behavioral signs

Behavioral parameters tested in an open-field were focused on 2 groups of signs: hypokinetic and asymmetrical signs. The unilateral 6-OHDA-induced lesion of the substantia nigra produces behavioral asymmetries most pronounced during the first few days after treatment, and animals show partial recovery after a few days. Therefore, to assess acute behavioral deficits, rats were tested 1 day after the lesion, and to assess the degree of recovery, the open-field test was repeated 10 days after the lesion.

Motor activity was measured as total ambulation time, distance covered in centimeters, total number of rearings and total resting time during the 15 min observation period. Asymmetrical behavioral signs were measured by the number of spontaneous left and right quarter-turns and the number of left and right forelimb use when leaning against the wall in rearing. Active thigmotaxic scanning e.g. the number of runs along the walls of the open-field with left or right side of the animals was also recorded.

2. Apomorphine-induced rotational behavior

Drug-induced rotational behavior was measured 2 weeks after the operation. Rats were given 0,1 mg/kg apomorphine subcutaneously. Rats were placed individually in observation cages, and the number of 360° turns away from the lesion side (right) were counted for 30 minutes.

c. Behavioral testing in a model of Huntington disease

1. Motor activity and asymmetrical behavioral signs

The QA-induced lesion leads to hyperkinesia and due to the unilateral lesions, animals perform asymmetrical motor activity. We used the same behavioral testing as the model of Parkinson's disease, and in addition, we also examined the signs 30 days after the injury.

Motor activity was measured as total ambulation time and total number of turning, and asymmetrical signs were measured as the number of left and right turns, forelimb use in rearing and runs along the walls (thigmotaxis).

2. Haloperidol-induced catalepsy test

Three weeks after the treatment we evaluated changes in haloperidol-induced catalepsy (0,5 mg/kg ip.). The typical catalepsy test consists of placing the animal into an unusual posture and recording the time taken to correct this posture within 3 min. Three different bar tests were evaluated. We placed the forepaws of the rats on 2 different round bars (7 and 10 cm high), or on the side of the glass (7 cm high) and the hindpaws remained on the floor.

E. Morphological examinations

a. Measurement of infarct volume in focal cerebral ischemia model

Twelve or 24 hours after MCAO, 2-mm-thick coronal sections were stained with 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride and then fixed in formalin. Brain areas were traced and measured using an image analysis system. Unstained areas were defined as ischemic lesions. The areas of infarcted tissue and the areas of both hemispheres were calculated for each brain slice. Infarct volumes are expressed as percentage of the total brain volume \pm SEM.

b. Histological examination in a model of Parkinson's disease

Following the behavioral testings, rats were intracardially perfused, and serial frontal 50 μ m-thick vibrotome sections from the substantia nigra were made. A mouse monoclonal antibody against tyrosine-hydroxylase (TH), a marker enzyme for dopaminergic neurons, was used for immunohistochemical analysis of dopaminergic cell survival.

TH-positive cells in each section on both contralateral and ipsilateral sides of the substantia nigra pars compacta (A9 cell group) and the ventral tegmental area (A10 cell group) were counted. The data are expressed as percentage of TH-positive cells in the lesioned side compared to the contralateral, undamaged side.

c. Histological examination in a model of Huntington disease

Following the behavioral testing, the number of neurons in the striatum was assessed by NADPH-diaphorase staining 30 days after the injury. NADPH-d-positive cells in each section on both contralateral and ipsilateral sides of the striatum were counted. The data are expressed as percentage of NADPH-d-positive cells in the lesioned side compared to the contralateral, undamaged side.

d. Histological examination in monosodium glutamate-induced retinal degeneration model

At 3 weeks of age, pups were perfused and both eyes were removed. Semithin sections (2 μ m) from the retina were stained with toluidine blue. Measurements of the thickness of the retinal layers were made with the NIH Image 1.55 program. The following parameters were measured: thickness of inner nuclear layer (INL) and inner plexiform layer (IPL) and distance between the inner and outer limiting membranes (ILM-OLM distance), thereby excluding the high variability of the outer segments of the photoreceptors.

F. Measurement of body temperature, systemic blood pressure and regional cerebral blood flow

Body temperature was controlled during the operation, because changing in body temperature influences the infarct size.

We measured blood pressure (n=6) by catheterizing the abdominal aorta. Blood pressure was monitored for 1 hour following icv administration of 2 μ g PACAP.

In another group of animals (n=6), regional cerebral blood flow was measured under pentobarbital anesthesia. A continuous laser doppler flowmeter was used to monitor cerebral blood flow over the parietal cortex. A burr hole of 1 mm diameter was drilled 5 mm lateral and 1 mm posterior from bregma point. The dura was left intact, and the probe was positioned on the dural surface. Saline was applied to moisten the dura and fill the space between the dura and the probe. PACAP (2 μ g) or vehicle was injected into the lateral ventricle, and changes in cerebral blood flow was monitored for 1 hour following injection. Values are given in percentage of pretreatment values \pm SEM.

G. Statistical analyses

Results are given as mean \pm SEM. Comparison between parametric data in the open-field was done by ANOVA followed by Neuman-Keul's *posthoc* analysis. Scores in the initial neurological testing, nonparametric data in the open-field test as well as the number of turns in the apomorphine test were compared using nonparametric ANOVA test followed by Dunn's *posthoc* analysis. The degree of asymmetry within one group was compared with Mann-Whitney test. The number of TH-positive cells was compared by ANOVA test followed by Dunn's *posthoc* analysis. The number of NADPH-diaphorase in the injured and uninjured sides was compared by Student's *t*-test. Treatment differences were considered significant at $P < 0.05$. The thickness of the retinal layers in the different groups was compared using ANOVA test followed by Neuman-Keul's *posthoc* analysis.

V. EFFECTS OF PRETREATMENT WITH PACAP IN FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA

A. Results

a. Orientation test

There was no significant difference between animals tested for orientation before the operations. Sham operation resulted in no change in response times. After MCAO, contralateral reaction times of both control and PACAP-treated animals significantly increased when compared to preoperative and sham operated values. Comparing vehicle- and PACAP-treated ischemic animals revealed that PACAP-treated rats reacted to the touch of the posterior body surface in a significantly shorter time, while no difference was observed in reaction times to other stimuli.

b. Measurement of infarct volume

The infarct volumes measured 12 hours after MCAO show that only 2 μ g PACAP reduced the infarct size significantly: infarct volume of the PACAP-treated animals was $5,85 \pm 3,2\%$, in control animals $14,85 \pm 7,2\%$. Infarct size of animals treated with 2 μ g PACAP and sacrificed 24 hours after MCAO ($10,25 \pm 5,3\%$) was significantly reduced by approximately 49% compared to control animals ($21,53 \pm 9,4\%$). PACAP treatment reduced the infarct volume by approximately 50% also in animals treated for 7 consecutive days with 2 μ g PACAP ($10,6 \pm 2,1\%$). However, it did not prove to be more effective than a single bolus preceding MCAO: there was no significant difference between animals receiving one preischemic bolus or 7.

c. Measurement of body temperature, systemic blood pressure and regional cerebral blood flow

Body temperature was controlled for 6 hours following MCAO, and no significant difference was observed between temperatures of control and PACAP-treated animals.

Arterial blood pressure did not show any difference before and during the observed 1 hour after the icv injection of 2 μ g PACAP. The cortical blood flow showed no significant changes in vehicle-treated animals during the 1-hour observation period. In animals injected with PACAP, relative cortical blood flow gradually increased during the first 15 minutes, and reached maximum increase 20 minutes after PACAP injection, which was significantly different from the pretreatment level. After this time-point, blood flow gradually returned to the original level.

B. Evaluation of the results

Our present study demonstrated that preischemic treatment with 2 μ g PACAP effectively reduced the infarct volume in a rat model of permanent MCAO and there was no significant difference between animals receiving one preischemic bolus or 7.

During the orientation test the reaction time to touch of the posterior body surface of PACAP-treated animals was significantly reduced. In contrast to anterior body parts, the representation of posterior body surface is in the penumbral, dorsomedial part of the parietal cortex, which remained unaffected in most PACAP-treated animals.

PACAP is present in the walls of cerebral and pial arteries, and is known to be an effective vasodilator in cerebral vessels. Our present results show that PACAP caused a transient, slight increase in the cerebral blood flow. Similar results were obtained in dogs. Although PACAP may be an effective vasodilator in cerebral vessels, this effect seems to be significant only in higher doses.

VI. AGE- AND GENDER DIFFERENCES AFTER UNILATERAL 6-OHDA-INDUCED LESION OF THE SUBSTANTIA NIGRA

A. Results

a. Behavioral testing

During the examination of the motor activity signs, young animals were significantly more active before the 6-OHDA-lesion when compared to aging rats, while there was no difference between males and females in the age-matching groups. One day after the lesion, motor activity was significantly reduced in all animals. Aging males showed more severe hypokinesia than young males, while there was no difference between the ambulation time of young and aging females 1 day after the injury. Although the activity was more severely reduced in young females than young males 1 day after the injury, the activity of both young and aging female rats returned to nearly normal levels by 10 days, while both young and aging males still had significantly lower levels of motor activity when compared to the 0-day values.

Turning activity showed a balance between left and right turns before the operation. Severe left-biased turning asymmetry was present in all 6-OHDA-treated groups 1 day after the lesion. Similar degree of asymmetry was still observed in young and aging males 10 days after the operation, in contrast to female animals which did not show significant difference between left and right turns.

Asymmetrical rearing activity showed significant left bias 1 day after the operation in all groups in contrast to the symmetrical rearings 1 day before the lesion. Rearing asymmetry could not be evaluated in aging males due to the complete lack of rearings at 1 day. By 10 days, animals showed less expressed asymmetry in rearings, but the recovery was significant only in young females which did not show any asymmetry at this time. Asymmetrical thigmotaxis showed a similar pattern.

b. Histological examination

TH-immunohistochemistry revealed no differences between the normal, uninjured sides of the substantia nigra in the different animal groups. There was a severe loss of dopaminergic cells in the substantia nigra pars compacta of male rats after 6-OHDA-induced lesion. The loss of dopaminergic cells on the lesioned side was more than 94% in male animals, with no significant difference between young and aging males. In contrast, female rats had significantly less, approximately 50-60%, dopaminergic cell loss which was significantly different from male animals at both ages.

B. Evaluation of the results

Our present results demonstrate that both young and aging females are less susceptible to 6-OHDA toxicity than their male counterparts, which is reflected in less dopaminergic cell loss in the substantia nigra and in less severe behavioral deficits. Also, aging animals respond

to 6-OHDA-induced lesion with more severe behavioral deficits, in spite of the similar degree of dopaminergic cell loss.

Age-related changes in the dopaminergic system and related behavioral parameters have been extensively studied, but the majority of publications deal with male animals. It has been previously described that locomotor activity declines in aging male animals. However, contradictions exist between different reports, on which activity measures are affected in aging animals. In spite of these contradictions, the general conclusion that activity declines with age, is in accordance with our present findings. In addition, we found that locomotion is decreased in aging females to a degree similar to that observed in aging males.

The susceptibility of animals to different neurotoxins causing degeneration of the dopaminergic neurons is known to be influenced by various factors, including strain, genetic factors, endogenous variables and age. It has been reported that aging animals show higher susceptibility to neurotoxins than younger ones, particularly when small quantities of the toxin are given. According to our results, the degree of dopaminergic cell loss is not different between young and aging animals, but the behavioral consequences are more pronounced in aging males than in young males. Interestingly, the recovery by 10 days was to a similar degree in aging and young males, which may be related to a similar degree of dopaminergic cell loss in the substantia nigra.

Sex-related changes in the open-field behavior have been previously described. Female rats are generally more active, even after gonadectomy, indicating that the higher locomotion observed in female rats is not solely dependent on gonadal hormones. According to our present results, normal female rats tended to be more active than males, but results did not reach statistical differences before the operation. However, there was a striking difference 10 days after the operation between males and females: both young and aging females showed significantly higher levels of activity than their male counterparts, which show that they recovered better from the acute hypokinesia.

As it has been mentioned earlier, susceptibility to neurotoxins are influenced by several factors. Experimental evidence for gender differences to neurotoxic insults, however, are limited. Our present results confirm these findings: female rats had significantly more TH-immunopositive cells in the substantia nigra than males. Furthermore, we could show this phenomenon also in aging females. The behavioral analysis proved that female rats had a significantly better recovery after the injury, and moreover, aging females did not show such severe acute hypokinesia.

The recovery of asymmetrical signs is believed to be related to the degree of dopaminergic lesion: animals with severe dopaminergic depletion show no recovery after the first week, while animals with less severe lesions show partial or complete recovery. Our findings show that male animals had a massive, more than 90% dopaminergic cell loss on the injured side, while female animals had only 50-60% cell reduction. This difference in the dopaminergic cell loss may explain the significantly better recovery of female animals in the hypokinetic and the asymmetrical signs. Interestingly, aging females ceased to display asymmetry only in turning and not in other asymmetrical signs, which could be due to the little more severe cell loss in the substantia nigra and/or less effective compensatory mechanisms.

In summary, our present study showed the age- and gender differences in the behavioral and histological outcome following 6-OHDA lesion of the substantia nigra. It was found that both young and aging male animals are more susceptible to 6-OHDA than females: female rats had a significantly less dopaminergic cell loss and responded to 6-OHDA with a significantly higher degree of behavioral recovery after the injury. Although young females had better recovery than aging females, aging females still had a much better behavioral recovery than their male counterparts.

VII. EFFECTS OF PACAP IN A MODEL OF PARKINSON'S DISEASE

A. Results

a. Behavioral testing

Motor activity 1 day postinjury was severely reduced in animals with 6-OHDA treatment, compared to normal or saline-treated groups. In contrast, there was no significant difference between PACAP-treated and normal or saline-treated rats at either time-points. Best effect in motor activity was achieved in animals treated with 0,1 µg PACAP.

Normal and saline-treated animals showed no significant turning asymmetry at either time-points. In all other animals, a severe left-biased turning asymmetry was observed 1 day after the injury. By 10 days, the significant difference between left- and right turns disappeared in all PACAP-treated animals. 6-OHDA-treated control rats still turned significantly more toward the left side. Similar pattern was observed in rearings with left and right forelimbs and in thigmotaxis.

b. Apomorphine-induced rotational behavior

Saline-treated animals showed no apomorphine-induced rotational behavior. In the 6-OHDA-treated control group, the average number of rotations during the 30 minute-observation period was $186,5 \pm 33,4$. PACAP-treated animals displayed markedly less rotations, the average was $65,0 \pm 26,8$, $17,06 \pm 6,9$ and $14,5 \pm 9,5$ in animals treated with 1, 0,1 and 0,01 µg PACAP, respectively. The difference between the 6-OHDA-treated control and PACAP-treated groups were significant.

c. Histological examination

TH-immunohistochemistry revealed severe loss of dopaminergic cells in the substantia nigra pars compacta in the control animals. The loss of dopaminergic cells on the lesioned side was approximately 90%. There was a significant cell loss also in the PACAP-treated animals when compared to saline-treated rats, but it was only approximately 50%. The average cell loss was significantly different in all PACAP-treated groups from the control group. There was no significant difference between the PACAP-treated groups.

In the ventral tegmental area, the cell loss in 6-OHDA-treated control animals was less expressed than in the substantia nigra: the number of dopaminergic cells on the left side was approximately 60% of the right side, which was a significant reduction compared to the saline-treated group. In all PACAP-treated animals, the cell loss was less than 10%, which was not significantly different from the saline-group, but significantly different from the control group.

B. Evaluation of the results

In the present study, we showed the neuroprotective effect of PACAP in 6-OHDA-induced lesion of the substantia nigra. We showed that pretreatment with PACAP at concentrations 0,01-1 µg rescued a large population of the dopaminergic neurons in the substantia nigra and, in addition, protected almost 100% of dopaminergic cells in the ventral tegmental area. PACAP-treated animals exhibited improved behavioral signs and they showed

amelioration in additional behavioral tests. The reduction in cell loss was accompanied with less severe acute neurological symptoms, especially in animals treated with lower doses of the peptide, and a more rapid amelioration of behavioral deficits could be observed compared to control animals.

PACAP has been shown to increase spontaneous motor and rearing activity when injected into the lateral ventricle in rats. Based on these observations, it is possible that the effect of PACAP on the locomotor activity further counteracted the loss of dopaminergic cells.

In contrast to general activity, severe acute asymmetrical signs were observed also in all PACAP-treated animals, similarly to the control group. It has been shown that animals undergo spontaneous recovery in asymmetrical signs after a few days. These observations are in accordance with the percentage of the spared dopaminergic neurons.

Our present study shows that PACAP is able to rescue dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area in 3 different doses. Although there was no difference in the TH-immunopositive cell number between the 3 PACAP-treated groups, behavioral amelioration was best in the group treated with 0,1 µg PACAP. Several studies have demonstrated the dose-dependent effects of PACAP. It is believed that different doses of PACAP act through different signal transduction pathways. Although the exact tissue concentration reached in our study is not known, the observation that better results were achieved by the lower doses of PACAP is in accordance with other studies.

VIII. EFFECTS OF PACAP IN A MODEL OF HUNTINGTON DISEASE

A. Results

a. Behavioral testing

QA-treated control animals showed significant hyperkinesia in motor activity tests 1 day after the injury compared to normal animals, but the time spent with ambulation and the total number of turns recovered to normal levels by 10 days. Animals treated with 2 µg PACAP showed similar tendency in the turning activity, but these animals spent significantly more time with ambulation both 1 and 10 days after the injury. However, rats treated with 0,2 µg PACAP displayed no hyperkinesia at any time-point.

Normal animals showed no significant asymmetry, but severe left-biased turning, rearing and wall runs were observed in all injured animals after the lesion. Asymmetrical signs were markedly present in QA-treated animals and in rats treated with 2 µg PACAP 1 day following the injury, with partial but not complete recovery by 10 and no further recovery by 30 days. Animals treated with 0,2 µg PACAP also showed significant asymmetry 1 day after the injury. However, these animals ceased to display asymmetry by 10 days.

b. Haloperidol-induced catalepsy test

Three weeks after the lesion the QA-treated and 2 µg PACAP-treated animals showed significantly less degree of catalepsy: they spent less time in the bars than the normal animals. However, there was no significant difference between the normal animals and rats treated with 0,2 µg PACAP in the high bar test and glass test.

c. Histological examination

NADPH-diaphorase staining revealed severe loss of neurons in the striatum ipsilateral to the QA injection in the control animals. The loss of neurons on the lesioned side was approximately 20%. There was a significant cell loss also in the 0,2 and 2 μg PACAP-treated animals, but it was only approximately 10%. The average cell loss was significantly different between the control and PACAP-treated animals.

B. Evaluation of the results

In summary, the unilateral QA lesion of the striatum produced hyperactivity and behavioral asymmetries most pronounced during the first few days after the operation, and animals showed partial recovery after 10 days with no further recovery by 30 days. PACAP treatment attenuated these behavioral deficits, and saved approximately half of the neurons.

The degree of cellular loss was not so expressed in the QA-treated animals compared to the rat model of Parkinson's disease where animals had an 80% or higher cell loss following 6-OHDA lesion. The used NADPH-diaphorase staining reveals the medium-sized aspiny neurons, which are relatively saved by QA-treatment. However, it has been reported that this partial neuronal degeneration more closely resembles the striatal neuropathology seen in human Huntington disease, which is why we chose to use this staining to evaluate the cellular loss in the QA-treated rats. PACAP treatment saved approximately half of the neurons which was accompanied by ameliorated behavioral symptoms.

Our results show that pretreatment with PACAP significantly attenuated the deficits caused by QA injection. Best effect was observed in 0,2 μg PACAP-treated animals, while the animals treated with 2 μg PACAP spent significantly more time with ambulation and the asymmetrical signs and rigidity were markedly present after the injury. Several studies have demonstrated the dose-dependent effect of PACAP and in these experiments, better results were achieved by the lower doses of PACAP. PACAP has also been shown to enhance locomotor activity at higher doses.

IX. EFFECTS OF PACAP IN MONOSODIUM GLUTAMATE-INDUCED RETINAL DEGENERATION

A. Results

The MSG treatment used in this study caused severe degeneration in the retina. When compared to untreated animals (where the average ILM-OLM distance was $163.7 \pm 5.4 \mu\text{m}$), the thickness of the MSG-treated control retinas was reduced by more than half (ILM-OLM distance: $79.7 \pm 4.5 \mu\text{m}$). This reduction was primarily due to the degeneration of the inner retinal layers. While there was no significant difference between the thickness of the photoreceptor layer, outer nuclear and outer plexiform layers, the INL and GCL seemed fused in the animals treated 3 times with MSG. These layers were reduced by more than half and the IPL was not discernible in these preparations. Retinas of the animals treated with 1 pmol PACAP (ILM-OLM distance: $91,5 \pm 5,38 \mu\text{m}$) simultaneously with the MSG treatment showed no significant difference from the control MSG-treated retinas. However, 100 pmol intravitreal PACAP dose could significantly attenuate the damage caused by the MSG-treatment (ILM-OLM distance: $91,5 \pm 5,38 \mu\text{m}$). Although the retinas were still significantly thinner than normal retinas, the inner retinal layers did not suffer such severe damage, and the INL, IPL and GCL layers were clearly discernible. The inner retinal layers were significantly thicker than those of the MSG-treated control animals, and the retinas showed nearly normal appearance.

B. Evaluation of the results

In the present study we have shown that intravitreal PACAP treatment significantly attenuated MSG-induced retinal degeneration. Repeated administration of high doses of MSG induced severe retinal degeneration which affected mostly the inner retinal layers. The identity of the surviving cell types is not known. Inner retinal cells, with the exception of ON bipolars, bear functional ionotropic glutamate receptors. Therefore, these cells are all potential targets of MSG toxicity. On the other hand, nearly the same set of neurons bear PACAP receptors. This explains why these cells could be able to survive the excitotoxic injury. The IPL remained slightly reduced after combined MSG and PACAP treatment in our experiments. This may be explained if we suppose that the OFF bipolar cells possess Ca-permeable non-NMDA type ionotropic glutamate receptors but do not bear PACAP receptors, thus they are susceptible to damage. Also, some of the ganglion cells possess numerous NMDA receptors, so PACAP-induced pathways may not provide full protection.

X. DISCUSSION

In the present study, we showed the neuroprotective effect of PACAP in focal cerebral ischemia, Parkinson's disease, Huntington disease and in monosodium glutamate-induced retinal degeneration. The exact mechanism of the protective effect of PACAP is not yet known. The four models used in the present study lead to cellular degeneration in different ways, but oxidative stress and glutamate-induced apoptosis are believed to be the main factors leading to the degeneration of the cells. The neuronal lesion in focal cerebral ischemia and in neurodegenerative diseases is also associated with inflammatory processes both in human patients and in animal models. PACAP has well documented neurotrophic and neuroprotective actions in both *in vitro* and *in vivo* models of different neuronal injuries. *In vitro*, it stimulates the growth and survival of neurons, prevents apoptosis, protects neurons against cytotoxicity induced by various agents, stimulates the differentiation and proliferation of the neurons during development, supports the expression and the effect of neurotrophic factors. PACAP has antiinflammatory effect both *in vitro* and *in vivo* experiments. *In vivo*, PACAP increases the number of surviving CA1 neurons in the hippocampus in global cerebral ischemia and protects cholinergic neurons in fornix transection. PACAP reduces the infarct size and ameliorates sensorimotor deficits in rat focal cerebral ischemia. Recently, PACAP has been proven to be neuroprotective in transient focal ischemia in mice, and in other models of neuronal damages, such as spinal cord and facial nerve injury in rats and optic nerve axotomy. PACAP is upregulated after different neuropathological changes, which implies that PACAP should be very important role during posttraumatic regeneration.

Besides the ischemic and neurodegenerative disorders the glutamate-induced toxicity is known to play a role in several retinal pathologies. There are several studies demonstrating that PACAP protects neurons against various cytotoxic agents, including glutamate-induced cytotoxicity. This explains why PACAP could be able to protect the retina against monosodium glutamate treatment.

The present study provides further evidence for the protective effects of PACAP in different types of neuronal injury. Based on our results, PACAP may be a promising neuroprotective agent in clinical treatment of neurological diseases.

There are numerous agents which have neuroprotective effects in different animal models of neuronal injuries, e.g.: glutamate antagonists, Ca^{2+} -channel blockers, antioxidant and antiinflammatory substances, estrogen, hypothermia. In spite of promising therapeutic effects, most of these agents fail to be effective in the clinical trials due to their toxic side effects, short therapeutic window or inability to pass through the blood-brain barrier. PACAP,

as an endogenous peptide, has no toxic effects in physiological concentrations and it can pass through the blood-brain barrier. These imply that PACAP may be an effective therapeutic agent in human diseases. The aim of the further experiments is to investigate the pathomechanism of PACAP in order to get more detailed insight of the neuroprotective effects exerted by PACAP.

XI. SUMMARY OF NEW FINDINGS

1., We demonstrated that preischemic treatment with 2 µg PACAP effectively reduced the infarct volume in a rat model of permanent MCAO and there was no significant difference between animals receiving one preischemic bolus or 7. During the orientation test the reaction time to touch of the posterior body surface of PACAP-treated animals was significantly reduced. Arterial blood pressure did not show any difference after the icv injection of 2 µg PACAP, but cortical blood flow gradually increased during the first 15 minutes, and reached maximum increase 20 minutes after PACAP injection. After this time-point, blood flow gradually returned to the original level.

2., We showed the age- and gender differences in the behavioral and histological outcome following 6-OHDA lesion of the substantia nigra. It was found that both young and aging male animals are more susceptible to 6-OHDA than females: female rats had a significantly less dopaminergic cell loss and responded to 6-OHDA with a significantly higher degree of behavioral recovery after the injury. The degree of dopaminergic cell loss is not different between young and aging animals, but the behavioral consequences are more pronounced in aging males than in young males.

3., We showed the neuroprotective effect of PACAP in 6-OHDA-induced lesion of the substantia nigra. We demonstrated that pretreatment with PACAP at concentrations 0,01-1 µg rescued a large population of the dopaminergic neurons in the substantia nigra and, in addition, protected almost 100% of dopaminergic cells in the ventral tegmental area. PACAP-treated animals exhibited improved behavioral signs and they showed amelioration in additional behavioral tests.

4., We proved that pretreatment with PACAP significantly attenuated the behavioral deficits and the number of lesioned neurons in the striatum in QA-induced injury, and the PACAP-treated animals showed significantly less degree of catalepsy.

5., We showed, for the first time, that PACAP is able to attenuate glutamate-induced toxic lesions of the retina *in vivo*.

XIV. ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank my tutors Dóra Reglődi M.D., Ph.D., István Lengvár M.D., Ph.D. and Valér Csernus M.D., Ph.D., D.Sc. who have made it possible to carry out this project and who always supported my scientific career. I wish to thank Gyula Lázár M.D., Ph.D., D.Sc. for his guidance at the beginning of my scientific work.

I express my gratitude the members of our research group Andrea Lubics M.D., Ph.D. and Márta Szelier for the help in histological works.

I express my thanks to László Lénárd M.D., Ph.D., D.Sc. and his research group from the Department of Physiology for the help in the behavioral examinations, and to Róbert Gábel Ph.D., D.Sc. and his research group from the Department of General Zoology and Neurobiology for the help in works with retinal degeneration. I am grateful to Zsolt Szántó M.D., Ph.D. from the Department of Surgery for his help in the laser doppler measurements and graphical drawings. I also thank all other colleagues in the Department of Anatomy.

At last but not at least, this work would have never been realized without the support and help of my family.

XV. PUBLICATIONS RELATED TO THE THESIS

1. **Tamás A**, Reglődi D, Szántó Z, Borsiczky B, Németh J, Lengvári I. Comparative neuroprotective effects of preischemic PACAP and VIP administration in permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neuroendocrinol Lett* 2002; 23: 249-254. IF.: 1,278.
2. **Tamás A**, Gábel R, Rácz B, Dénes V, Kiss P, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium-glutamate. *Neurosci Lett* 2004; 372: 110-113. IF.: 2,019.
3. **Tamás A**, Lubics A, Szalontay L, Lengvári I, Reglődi D. Age- and gender differences in behavioral and morphological outcome after 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Behav Brain Res* 2005; 158: 221-229. IF.: 2,992.
4. **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Protective effects of PACAP in excitotoxic striatal lesion. *Ann NY Acad Sci* (in press) IF.: 1,789.
5. **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Reglődi D. Effects of age, gender, and gonadectomy on neurochemistry and behavior in animal models of Parkinson's disease. *Endocrine* (in press) IF.: 1,515.
6. Reglődi D, **Tamás A**, Somogyvári-Vígh A, Szántó Z, Kertes E, Lénárd L, Arimura A, Lengvári I. Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides* 2002; 23: 2227-2234. IF.: 2,635.
7. Reglődi D, **Tamás A**, Lengvári I. Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Bull* 2003; 59: 459-466. IF.: 2,609.
8. Reglődi D, Lubics A, **Tamás A**, Szalontay L, Lengvári I. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2004; 151: 303-312. IF.: 2,992.
9. Reglődi D, **Tamás A**, Lubics A, Szalontay L, Lengvári I. Morphological and functional effects of PACAP in a 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regul Pept* 2004; 123: 85-95. IF.: 2,531.
10. Reglődi D, **Tamás A**, Somogyvári-Vígh A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in animal models of neurodegenerative disorders - implications for Huntington and Parkinson's diseases. *Lett Drug Des Disc* 2005; 2: 311-315.

11. Reglődi D, **Tamás A**, Lengvári I, Tóth G, Szalontay L, Lubics A. Comparative study on the effects of PACAP in young, aging, and castrated males in a rat model of Parkinson's disease. Ann NY Acad Sci (in press) IF.: 1,789.

Published abstracts related to the thesis: 13; impact factor of the published abstracts: 12,063

Oral presentations related to the thesis: 15

Posters related to the thesis: 25

XV. PUBLICATIONS NOT RELATED TO THE THESIS

1. Németh J, Jakab B, Reglődi D, Lubics A, Józsa R, Hollósy T, **Tamás A**, Lengvári I, Göres T, Szolcsányi J. Comparative distribution of VIP in the central nervous system of various species measured by a new radioimmunoassay. Regul Pept 2002; 109: 3-7. IF.: 3,205.
2. Reglődi D, Kiss P, **Tamás A**, Lengvári I. The effects of PACAP and PACAP antagonist on the neurobehavioral development of newborn rats. Behav Brain Res 2003; 140: 131-139. IF.: 2,817.
3. Jakab B, Reglődi D, Józsa R, Hollósy T, **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Oroszi G, Szilvássy Z, Szolcsányi J, Németh J. Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. J Biochem Biophys Meth 2004; 61: 189-198. IF.: 1,302.
4. Reglődi D, Fábián Zs, **Tamás A**, Lubics A, Szeberényi J, Alexy T, Tóth K, Márton Zs, Borsiczky B, Róth E, Szalontay L, Lengvári I. Effects of PACAP on *in vitro* and *in vivo* neuronal cell death, platelet aggregation, and production of reactive oxygen radicals. Regul Pept 2004; 123: 51-59. IF.: 2,531.
5. Farkas O, **Tamás A**, Zsombok A, Reglődi D, Pál J, Büki A, Lengvári I, Povlishok JT, Dóczi T. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in a rat model of traumatic brain injury. Regul Pept 2004; 123: 69-75. IF.: 2,531.
6. Lubics A, Reglődi D, **Tamás A**, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic/ischemic injury. Behav Brain Res 2005; 157: 157-165. IF.: 2,992.
7. Józsa R, Hollósy T, **Tamás A**, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide plays a role in olfactory memory formation in chicken. Peptides 2005; 26: 2344-2350. IF.: 2,511.
8. Kiss P, **Tamás A**, Lubics A, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I, Reglődi D. Development of neurological reflexes and motor coordination in rats neonatally treated with monosodium glutamate. Neurotox Res 2005 (in press)
9. Gasz B, Rác B, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, **Tamás A**, Cserepes B, Lubics A, Gallyas F Jr, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. Peptides 2005 (in press) IF.: 2,511.
10. **Tamás A**, Zsombok A, Farkas O, Reglődi D, Pál J, Büki A, Lengvári I, Povlishock JT, Dóczi T. Postinjury administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) attenuates traumatically induced axonal injury in rats. J Neurotrauma (in press) IF.: 2,866.
11. Rác B, **Tamás A**, Kiss P, Tóth G, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Gallyas F Jr, Róth E, Reglődi D. Involvement of ERK and CREB signalling pathways in the protective effect of PACAP on monosodium glutamate-induced retinal lesion. Ann NY Acad Sci (in press) IF.: 1,789.

12. Kiss P, **Tamás A**, Lubics A, Lengvári I, Szalai M, Hauser D, Horváth Zs, Rác B, Gábel R, Babai N, Tóth G, Reglődi D. Effects of systemic PACAP treatment in monosodium glutamate-induced behavioral changes and retinal degeneration. *Ann NY Acad Sci* (in press) IF.: 1,789.
13. Babai N, Atlasz T, **Tamás A**, Reglődi D, Kiss P, Gábel R. Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retina degeneration. *Neurotox Res* 2005 (in press)
14. Babai N, Atlasz T, **Tamás A**, Reglődi D, Tóth G, Kiss P, Gábel R. Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina. *Ann NY Acad Sci* (in press) IF.: 1,789.
15. Molnár L, Pollák E, Boros Á, Reglődi D, **Tamás A**, Lengvári I, Arimura A, Lubics A. Comparative anatomy of PACAP-immunoreactive structures in the ventral nerve cord ganglia of lumbricid *Oligochaetes*. *Ann NY Acad Sci* (in press) IF.: 1,789.
16. Németh J, **Tamás A**, Józsa R, Horváth JE, Jakab B, Lengvári I, Arimura A, Lubics A, Reglődi D. Changes in PACAP levels in the central nervous system after ovariectomy and castration. *Ann NY Acad Sci* (in press) IF.: 1,789.
17. Atlasz T, Kőszegi Zs, Babai N, **Tamás A**, Reglődi D, Kovács P, Hernádi I, Gábel R. Microiontophoretically applied PACAP blocks excitatory effects of kainic acid in vivo. *Ann NY Acad Sci* (in press) IF.: 1,789.
18. Józsa R, Németh J, **Tamás A**, Hollósy T, Lubics A, Jakab B, Oláh A, Lengvári I, Arimura A, Reglődi D. Short-term fasting differentially alters PACAP and VIP levels in the brains of rats and chickens. *Ann NY Acad Sci* (in press) IF.: 1,789.
19. Gasz B, Rác B, Róth E, Borsiczky B, **Tamás A**, Boronkai Á, Tóth G, Reglődi D. PACAP inhibits oxidative stress-induced activation of MAP kinase dependent apoptotic pathway in cultured cardiomyocytes. *Ann NY Acad Sci* (in press) IF.: 1,789.

Published abstracts not related to the thesis: 22; impact factor of the published abstracts: 33,199

Oral presentations not related to the thesis: 3

Posters not related to the thesis: 37

Impact factor of publications related to the thesis: 22,149

Cumulative impact factor: 59,326

Cited by others: 33

All citation: 56